

## BAB 2

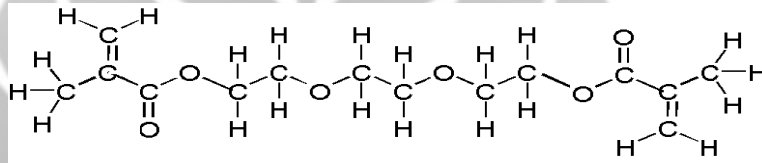
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Triethylene Glycol Dimethacrylate (TEGDMA)*

*Triethylene Glycol Dimethacrylate (TEGDMA)* adalah salah satu komponen resin komposit yang berfungsi untuk mengurangi viskositas matriks resin.<sup>2</sup> Dalam bidang kedokteran gigi, resin komposit mempunyai banyak kegunaan, salah satunya sebagai material restorasi.<sup>1</sup> Saat ini, resin komposit telah menjadi pilihan utama dalam berbagai perawatan di bidang kedokteran gigi karena keunggulan mempunyai estetis yang baik, sifatnya yang tidak mudah larut dan tidak peka terhadap dehidrasi, tidak mahal, dan relatif mudah dimanipulasi.<sup>2</sup>

Resin komposit adalah material restorasi sewarna gigi yang merupakan campuran dari resin akrilik dan partikel pengisi keramik. Kandungan utama resin komposit adalah matriks resin dan partikel pengisi anorganik (*filler*). Disamping kedua komponen bahan tersebut, suatu bahan *coupling (silane)* diperlukan untuk memberikan ikatan antara bahan matriks dan pengisi anorganik, serta activator-inisiator untuk polimerisasi resin. Matriks yang paling umum digunakan adalah *Bisfenol A-glisidil metakrilat (bis-GMA)* dan *urethan dimethakrilat (UEDMA)* yang merupakan monomer dengan berat molekul tinggi sehingga memiliki viskositas yang tinggi. Untuk mengurangi kekentalan basis resin, ditambahkan monomer dimetakrilat dengan viskositas rendah yaitu TEGDMA. Penambahan TEGDMA pada matriks resin komposit akan mempermudah aplikasi resin komposit. Namun, penambahan TEGDMA atau dimetakrilat dengan berat molekul rendah akan meningkatkan kontraksi pada saat polimerisasi, sehingga membatasi jumlah dimetakrilat dalam resin komposit.<sup>2</sup> Konsentrasi TEGDMA yang terdapat dalam resin komposit bervariasi, yaitu antara 30% sampai 50%.<sup>1</sup>

Diantara beberapa substansi organik yang ada dalam resin komposit, TEGDMA sangat mempengaruhi unsur biologik sel. Faktor-faktor yang mendukung pernyataan ini diantaranya berat molekul yang rendah, sifat hidrofilik yang tinggi sehingga monomer TEGDMA mudah terlepas dalam lingkungan yang basah seperti lingkungan oral, dan dapat melarutkan lapisan lipid membran sel sehingga TEGDMA dapat penetrasi ke seluruh kompartemen biologik dan ruang intraselular serta ekstraselular, termasuk membran dan nukleus sel. Hal tersebut dapat menyebabkan efek sitotoksik.<sup>14</sup> Struktur kimia TEGDMA dapat dilihat pada gambar 2.1.<sup>15</sup>



Gambar 2.1. Struktur kimia TEGDMA<sup>15</sup>

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa TEGDMA bersifat sitotoksik. Toksisitas yang dihasilkan bergantung pada waktu dan konsentrasi TEGDMA yang dilepaskan oleh resin komposit.<sup>4</sup> Powis dkk, melaporkan bahwa efek toksik yang dihasilkan oleh material restorasi dalam hal ini khususnya resin komposit, disebabkan oleh larutnya komponen material bahan tersebut.<sup>16</sup> Penelitian Geurtsen dkk, melaporkan bahwa larutnya TEGDMA merupakan penyebab utama reaksi sitotoksik material resin komposit.<sup>17</sup> *National Institute of Occupational Safety and Health* telah mengklasifikasikan TEGDMA sebagai iritan terhadap bermacam jaringan.<sup>18</sup>

TEGDMA dapat mempengaruhi struktur dan metabolisme selular dengan menurunkan lipid membran sel, menurunkan glutathion intraselular, menghilangkan sejumlah rangkaian DNA dan menyebabkan mutasi gen.<sup>5,6</sup> Stanislawski dkk, menyatakan bahwa TEGDMA toksik terhadap sel fibroblas manusia.<sup>7</sup> Sedangkan Janke dkk, melaporkan bahwa TEGDMA tidak hanya toksik terhadap fibroblas manusia namun juga terhadap sel

fibroblas gingival manusia. Paparan TEGDMA 5 mM dan 7,5 mM selama 24 jam menghambat proliferasi sel fibroblas gingival manusia. Tidak terjadi peningkatan frekuensi apoptosis atau nekrosis sel fibroblas gingival manusia saat paparan TEGDMA 1 mM atau 2,5 mM selama 24 jam. Namun, terjadi apoptosis sel fibroblas gingiva manusia saat paparan TEGDMA 5 mM dan 7,5 mM selama 24 jam. Peningkatan apoptosis sel fibroblas gingiva manusia tertinggi terjadi saat paparan TEGDMA 7,5 mM selama 24 jam.<sup>4</sup> Spagnuolo G dkk, melaporkan bahwa TEGDMA juga dapat mengakibatkan terjadinya apoptosis dan nekrosis pada sel pulpa manusia. Paparan TEGDMA 2 mM selama 12 jam menunjukkan lebih banyak sel yang nekrotik dibandingkan apoptosis. Peningkatan konsentrasi TEGDMA dan waktu paparan TEGDMA dapat meningkatkan tingkat nekrotik sel pulpa manusia.<sup>19</sup> TEGDMA dilaporkan sering menyebabkan kontak dermatitis pada praktisi dental, dan menimbulkan reaksi alergi.<sup>8</sup> Penelitian terbaru oleh Dhamma Ranti dkk, melaporkan bahwa TEGDMA menimbulkan efek toksik terhadap sel pulpa gigi, dengan menurunkan konsentrasi protein total sel dan medium kultur.<sup>20</sup>

TEGDMA dapat masuk ke dalam tubuh melalui beberapa cara. Pada dental personel, TEGDMA dapat masuk ke dalam tubuh melalui absorpsi pada kulit.<sup>21</sup> Dalam rongga mulut, apabila pada saat digunakan resin komposit tidak mengalami polimerisasi sempurna, maka monomer TEGDMA akan terlepas dan larut dalam saliva dalam beberapa menit sampai jam. Selanjutnya monomer TEGDMA akan berdifusi mencapai dentin dan pulpa dalam beberapa jam sampai hari setelah penempatan restorasi komposit. Hal tersebut dilaporkan dapat menimbulkan reaksi inflamasi dan nekrosis pulpa gigi.<sup>3</sup>

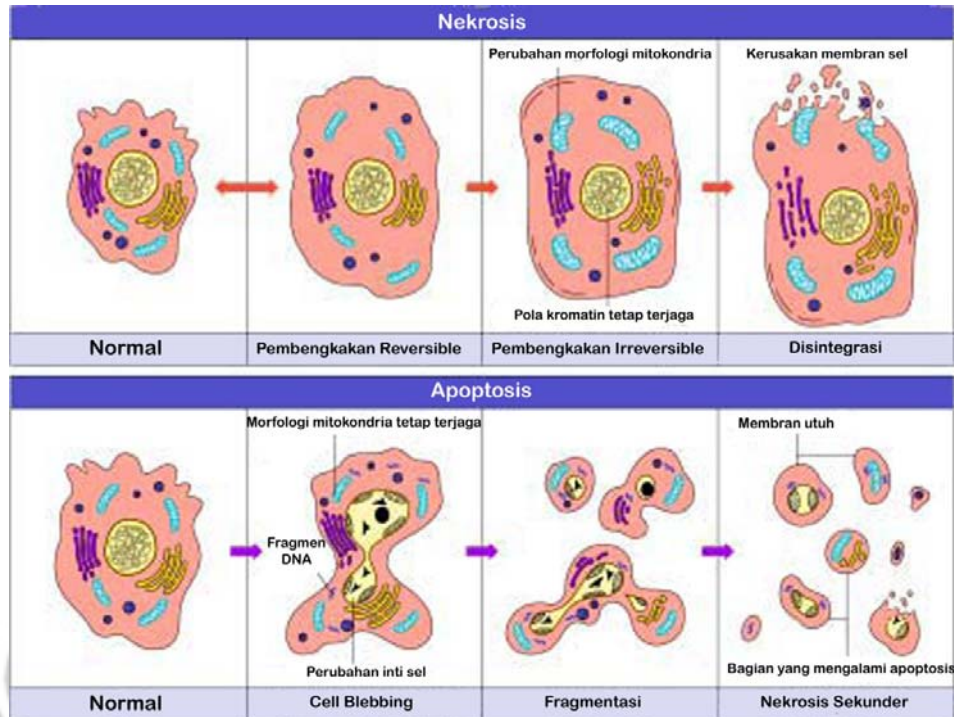
## 2.2 Sel Pulpa Gigi

Pulpa merupakan suatu jaringan ikat yang terdapat di dalam dentin yang keras. Pulpa memiliki fungsi formatif, nutritif, protektif dan defensif terhadap gigi.<sup>10,22</sup> Karena fungsinya yang sangat kompleks, pada pulpa

terdapat banyak sekali pembuluh darah, jaringan syaraf, dan sel yang sangat penting dalam menjaga vitalitas gigi.<sup>10,11,22</sup>

Sel yang mendominasi jaringan pulpa gigi adalah sel fibroblas. Sel-sel fibroblas bentuknya gepeng dengan inti yang bulat. Fungsi fibroblas adalah membentuk substansi dasar dan serabut kolagen, yang merupakan matriks pulpa. Fibroblas juga berperan dalam degradasi kolagen dan deposisi jaringan yang telah mengapur sehingga penting dalam remodeling jaringan ikat. Pulpa juga mempunyai sel odontoblas pada daerah yang dekat dengan predentin. Fungsi utama odontoblas ini adalah memproduksi komponen matriks organik predentin dan dentin. Sel-sel lain juga ditemukan pada pulpa diantaranya, makrofag, limfosit dan sel plasma. Makrofag ditemukan terutama dekat dengan pembuluh darah. Sel-sel ini adalah monosit darah yang berpindah ke dalam jaringan pulpa. Fungsinya adalah untuk fagositosis debris nekrotik dan benda asing. Limfosit dan sel plasma berfungsi sebagai penjagaan imun dengan cara mengenali antigen yang masuk ke dalam tubuh. Selain itu terdapat sel mesenkim yang belum terdiferensiasi berasal dari sel mesenkim papilla gigi. Karena fungsinya dalam perbaikan dan regenerasi, sel-sel tersebut tetap memiliki ciri pluripotensial dan dapat berkembang menjadi fibroblas, odontoblas, makrofag, atau osteoklas.<sup>22</sup>

Seperti sel-sel lainnya, sel pulpa dapat mati melalui dua mekanisme, apoptosis dan nekrosis. Beberapa bahan kimia dapat toksik terhadap sel sehingga menyebabkan sel mati. Nekrosis merupakan hasil kerusakan selular karena kehilangan fungsi protein atau integritas membran plasma. Sedangkan apoptosis (kematian sel terprogram) adalah proses fisiologi dimana sel yang tidak dibutuhkan tereliminasi selama perkembangan dan proses biologis normal lainnya. Pada apoptosis, kematian sel yang terjadi di bawah kondisi normal dan sel ikut serta aktif dalam kematiannya. Perbedaan nekrosis dan apoptosis dapat dilihat pada gambar 2.2.<sup>23</sup>



Gambar 2.2. Ilustrasi gambaran morfologi nekrosis dan apoptosis<sup>23</sup>

### 2.3 Kultur Sel

Salah satu teknik pengamatan yang dilakukan untuk mempelajari dan memahami biologi sel adalah kultur sel.<sup>13</sup> Istilah “kultur sel” berarti kultur yang menggunakan sel-sel yang telah terpisah dari jaringan asalnya. Pada kultur sel, sel-sel tidak lagi bergabung menjadi jaringan. Sel-sel dipisahkan (baik secara mekanis maupun enzimatik) menjadi suspensi sel yang kemudian dikultur pada medium kultur.<sup>24</sup> Dalam kultur, sel yang hidup dapat menampilkan sifat-sifat yang sesuai dengan lingkungan yang asli. Kultur sel merupakan model studi yang baik untuk mempelajari biologi sel, biokimia sel serta aktivitas intraselular, interaksi sel dengan agen penyebab penyakit, dan efek suatu zat kimia atau obat terhadap sel.<sup>13</sup>

Bila sel dipindahkan dari suatu jaringan, sel akan melanjutkan perkembangan hidupnya apabila berada dalam kondisi yang tepat dan dilengkapi dengan medium yang mengandung zat makanan dan faktor pertumbuhan yang sesuai. Sel-sel tersebut mampu berkembang biak dan meningkatkan ukurannya terus menerus, namun perkembangan sel akan terbatas oleh beberapa variabel kultur seperti penurunan nutrisi yang

terkandung dalam medium kultur.<sup>25</sup> Kultur sel berpotensi untuk mengalami kontaminasi, namun penambahan antibiotik yaitu *penicillin* dan *streptomycin* kedalam medium kultur dapat menyelesaikan masalah tersebut. Kontaminasi mikroba juga dapat dikurangi dengan penggunaan *laminar air flow cabinet*, yang akan mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi oleh bakteri yang berasal dari udara.<sup>24</sup>

Kultur sel yang disiapkan secara langsung dari jaringan atau suatu organisme disebut kultur primer. Kultur primer yang dikultur kembali untuk diperbanyak dan diperluas dan dibagi untuk mengembangkan replikasi kultur dinamakan subkultur.<sup>13,24</sup>

#### **2.4 Protein Total Medium Kultur Sebagai Indikator Toksisitas**

Protein merupakan polipeptida yang tersusun atas sejumlah asam-asam amino.<sup>26</sup> Setiap protein tersusun atas asam amino yang berbeda. Urutan asam amino yang spesifik dalam setiap protein tersebut, menentukan karakteristik dan fungsi protein.<sup>27</sup> Di dalam tubuh protein bertindak sebagai enzim, elemen struktural, hormon, immunoglobulin. Protein juga terlibat dalam transpor oksigen, kontraksi otot, penghantar impuls syaraf. Selain itu, protein juga berfungsi sebagai penunjang mekanis dan sumber energi.<sup>27,28</sup>

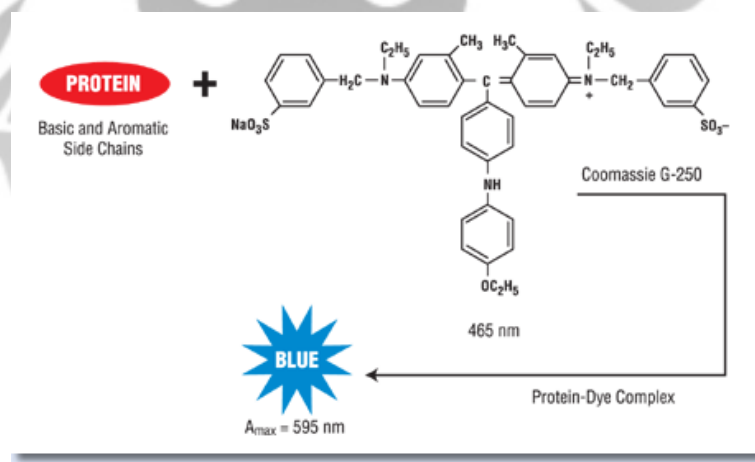
Komposisi terbesar dari sel adalah protein, yang mencapai lebih dari 50% berat kering sel.<sup>12</sup> Protein sangat penting dalam struktur dan fungsi kehidupan sel.<sup>27</sup> Protein dalam sel dibutuhkan untuk seluruh aktivitas sel. Protein disintesis dalam sel dari sejumlah asam amino sehingga sel membutuhkan asam amino untuk mensintesis protein. Kemudian, protein yang dihasilkan oleh sel akan digunakan untuk seluruh aktivitas sel. Oleh karena itu, sintesis dan sekresi protein yang mencerminkan aktivitas sel dapat digunakan sebagai indikator viabilitas sel.

Dalam kultur sel, sintesis dan sekresi protein dapat diketahui dari protein total medium kultur. Sel-sel dalam kultur akan melakukan proliferasi dan diferensiasi. Aktivitas tersebut memerlukan protein yang

dapat diperoleh dari protein yang terkandung dalam medium kultur. Beberapa protein yang disintesis didalam sel akan disekresikan ke medium kultur. Oleh karena itu, protein total medium kultur dapat digunakan sebagai indikator aktivitas sel berhubungan paparan zat toksik.

Metode yang paling sering digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam sel adalah *Bradford protein assay*. Prinsip kerja metode ini berdasarkan aksi perubahan warna *Coomassie Brilliant Blue G-250 dye* (CBBG) pada saat berikatan dengan protein. (Gambar 2.3)<sup>29,30</sup> *Coomassie Brilliant Blue G-250 dye* (CBBG) pertama kali diperkenalkan oleh Dr. Marion Bradford pada tahun 1976 untuk mendeteksi dan menghitung jumlah protein total.<sup>30</sup>

Larutan *Coomassie Brilliant Blue G-250 dye* (CBBG) bersifat asam dan berwarna merah kecoklatan (absorbansi maksimum 465 nm). Apabila larutan tersebut berikatan dengan protein akan bersifat basa. Keadaan basa ini akan mengubah warna larutan menjadi biru (absorbansi maksimum 610 nm).<sup>30</sup> Jumlah protein sel dapat diketahui dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 465-595 nm.<sup>29</sup>



Gambar 2.3. Prinsip kerja *Coomassie Brilliant Blue G-250 dye* (CBBG)<sup>30</sup>

## 2.5 Profil Protein Medium Kultur

Protein Medium Kultur adalah suatu gambaran jenis-jenis protein yang terkandung dalam medium kultur. Profil protein merupakan karakteristik protein secara kualitatif dalam sel pulpa. Profil protein ini akan mengalami perubahan bermakna pada keadaan patologik.<sup>12</sup> Analisa profil protein dilakukan dengan melihat perbedaan tampilan *band* pada gel electrophoresis. Teknik yang dipakai adalah SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yaitu suatu metode yang digunakan untuk menilai proses purifikasi dan menentukan berat molekul protein dengan jelas. Metode ini akan memisahkan protein berdasarkan berat molekul.<sup>31,32</sup>

Protein pada umumnya mempunyai muatan positif atau negatif yang menggambarkan campuran muatan asam amino yang terkandung di dalamnya. Apabila molekul protein ditempatkan pada lingkungan elektrik, protein akan bermigrasi sesuai dengan muatan, ukuran, dan bentuknya.<sup>12</sup>

SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) adalah detergen yang dapat memecahkan molekul *hydrophobic* dan juga dapat mengikat ion negatif (sulfat) pada suatu molekul. SDS akan memecahkan membran protein dan melapisi protein dengan ion negatif. Pada teknik SDS PAGE, saat protein ditempatkan pada lingkungan elektrik maka protein akan bergerak menuju anoda positif. (gambar 2.4) Karena pada teknik ini menggunakan *gel polyacrylamide*, maka laju perpindahan protein akan terseparasi berdasarkan perbedaan berat molekul. Molekul yang kecil akan bergerak lebih cepat melalui *gel polyacrylamide* dibandingkan molekul yang lebih besar.<sup>31,32</sup>



Gambar 2.4. Migrasi protein yang berlaku sebagai muatan negatif bergerak menuju kutub positif pada *gel polyacrylamide* yang diberi muatan arus listrik.<sup>32</sup>



*Band-band* protein yang terbentuk pada gel akan terlihat setelah proses pewarnaan dengan menggunakan *Coomassie blue* dan *silver staining*. Pewarnaan dengan menggunakan *Coomassie blue* merupakan metode pewarnaan gel yang paling sederhana. *Coomassie blue* dapat mewarnakan hingga 5 - 500 ng protein yang terdapat pada matriks gel.<sup>32</sup> Namun beberapa protein dengan berat molekul rendah terkadang tidak dapat tampak hanya dengan pewarnaan *Coomassie blue*, sehingga pewarnaan dengan silver dapat dimanfaatkan.<sup>12,35</sup>

*Silver staining* atau pewarnaan dengan menggunakan silver nitrat merupakan metode pewarnaan protein yang cepat dan sensitif. Silver nitrat akan berikatan dengan asam amino sehingga proses pewarnaan dapat terjadi. *Silver staining* dapat menangkap dengan jelas 0,05 – 0,6 ng protein yang terdapat dalam matriks gel pada setiap *band*-nya. Hal tersebut menunjukkan bahwa pewarnaan dengan menggunakan *silver stain* merupakan pewarnaan yang 100 kali lebih sensitif dibandingkan pewarnaan dengan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* dan memungkinkan untuk mendeteksi protein yang lebih rendah.<sup>36</sup>

Berat molekul tiap tampilan *band* protein dapat diketahui dengan membandingkan *band-band* protein yang terbentuk pada *gel electrophoresis* dengan marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.<sup>37</sup>

## 2.6 Kerangka Teori

