

PENURUNAN *OPTICAL DENSITY* DNA PADA EPITEL MUKOSA RONGGA MULUT KARENA PEMAKAIAN RESIN AKRILIK *COLD CURING*

I.G.K. Wahyu Ardhani^{*)}

ABSTRACT

DNA OPTICAL DENSITY DECREASE OF EPITHELIAL ORAL MUCOUSE CAUSED BY RESIN ACRYLIC COLD CURING

Optical density (OD) is a intensity colored at a certaince absorbance. It means the OD, which can be detect by spectrofotometer. The assotiation of OD grade is a sequence of DNA amino acid. More better of a dental material more sintesis the sequence of DNA amino acid. Until now there isn't known a influence of cold curing resins on the decrease of the DNA OD of epithelial oral mucouse. Resins cytotoxicity is postulated as product reaction or a part, that is non polimerized cold curing resins, that is leach out from a denture base. Light-Polimerized resins was proved that could be inhibit a replication of the epithelial oral mucouse. It shown that DNA sintesis more sensitive effect for citotoxicity material, that it cause deviation of oral mucouse.

This in vitro stydy examined the DNA OD of fibroblast cell BNK-21 because a expose of MMA monomer as equal as DNA sintesis of oral mucouse epitelial cell.

DNA extraction was used Chelex to examine the DNA OD. Chelex was used because it has some advantance likes: easy prosedure, high precision and has economy value (Promega).

The results of this study are in each exposed of MMA monomer reduce the DNA OD from the cell culture at the time incubation 12 and 18 hours. The mitosis process or cell multiplication depend on the protein gen regulation. The cell can growth abnormally because there is no inhibition contact any more. Some inductor that can be fosforilation induction at transcription DNA are uv light, c AMP, phorbolester, and heavy metal salt and hitshock. Activation gen by fosforilation can be influence the function from the promoter of nucleotid sequence. Gen that regulate the fosforilation or prolifiration is decided by: c-Fos-Gen containing TATA BOX which is primary signal transcription. This become a question why this results of this study different from the previous study. The most possibility is the fact that MMA monomer influence on fosforilisation. The fosforilisation is the importance stage of primarily transcription. By this way the DNA sintesis to start. This should be carefull

^{*)} Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

for uncontrol DNA sintesis. Hence, a methyl methacrylate of cold curing resins can influence the DNA OD with assumption there is the disturbance of DNA sintesis.

Keywords: *Methyl methacrylate, resins cytotoxicity, DNA sintesis disturbance*

PENDAHULUAN

Proses polimerisasi metil metakrilat resin akrilik *cold curing* dapat terjadi pada tekanan dan suhu kamar (Anusavice, 1997). Proses polimerisasi untuk semua jenis polimer tidak dapat 100% terjadi sempurna, maka selalu terbentuk monomer sisa. Keburukan jenis *cold curing* ini adalah kadar monomer sisa yang terbentuk cukup tinggi (Vallitu, 1995 dan Anusavice, 1997). Monomer sisa adalah monomer yang tidak bereaksi setelah polimerisasi selesai (Annusavice, 1997). Pada penelitian pendahuluan kami, terbukti bahwa kadar monomer sisa resin ortodonsi *Ortho Resin* dari polimerisasi pada tekanan dan suhu kamar, kadar monomer sisa yang terbentuk sebesar 5,27%, sedang polimerisasi pada tekanan 2 atm dan suhu 50° C sebesar 1,15% (IG.A.Wahju Ardani, 1999). Monomer sisa selain dapat mempengaruhi sifat fisik resin akrilik, monomer sisa dalam jumlah banyak dapat mengiritasi atau menyebabkan hipersensifitas terhadap jaringan mukosa rongga mulut (Zografakis dkk, 1994 dan Anusavice, 1997). Bahkan dibuktikan resin akrilik cold curing untuk merek Will-o-dont toksik pada uji kultur sel (Zentner dkk., 1994).

Optical density (OD) adalah suatu intensitas pewarnaan pada panjang gelombang tertentu, artinya dengan OD yang dapat ditangkap oleh spektrofotometer (Lefebvre dkk,1994). Ini menunjukkan bahwa derajat asosiasi pewarnaan tersebut terhadap *sequence* asam amino dari DNA (Lefebvre dkk., 1994). Jadi apabila OD DNA makin tinggi, maka makin banyak DNA yang disintesa (Lefebvre dkk., 1994). Artinya, makin baik suatu bahan *dental material* yang diuji (Lefebvre dkk., 1994). Hingga saat ini belum diketahui pengaruh bahan resin akrilik *cold curing* terhadap penurunan OD DNA pada epitel mukosa rongga mulut.

Sitotoksisitas resin dipostulasikan sebagai reaksi dari produk atau komponen yang tidak bereaksi (tidak terpolimerisasi), yang dilepaskan oleh suatu bahan (Levebre dkk., 1994). Metil metakrilat resin akrilik dari *light polymerized* telah dibuktikan dapat menghambat replikasi sel epitel mukosa rongga mulut, dimana sintesis DNA lebih sensitif terhadap efek toksik

bahan yang dapat berkaitan dengan penyebab terjadinya kelainan patologi rongga mulut (Barron dkk., 1993).

Dari penelitian pendahuluan kami, terbukti penurunan pertumbuhan sel yang signifikan pada polimerisasi pada tekanan dan suhu kamar (Wahju Ardani, 1999). Terjadinya penurunan pertumbuhan sel atau mitosis sel, kemungkinan disebabkan oleh adanya gangguan sintesa DNA, dimana keadaan ini dapat menyebabkan regenerasi sel menjadi terganggu, sehingga proses penyembuhan juga akan mengalami gangguan (Kumar V, 1997).

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan adanya gangguan sintesis DNA yang ditunjukkan dengan adanya penurunan *optical density* DNA epitel mukosa rongga mulut oleh karena pemakaian resin akrilik *cold curing*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap patogenesis suatu kelainan di rongga mulut; dengan demikian dapat memberikan kepastian bahwa keamanan bahan resin akrilik *cold curing* tersebut kurang memberikan keamanan untuk dipakai di dalam rongga mulut, terutama di bidang Kedokteran Gigi khususnya bidang ortodonsia.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini: monomer MMA (Merck); Kultur sel: digunakan *cell line* BHK-21 clone 21 (fibroblast sel ginjal dari baby hamster); Media kultur: *Minimum Essential Medium*, *bovine serum*, 100 µ/ml penisilin, dan 10 µg/ml streptomisin; Phosphat Buffer Saline (PBS) t.d.: KH_2PO_4 ; NaCl; dan $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Aquadest; *Celex*.

Mula-mula dipersiapkan sel BHK-21 sebanyak 50.000 sel epitel dalam 200 µl MEM baru (fresh). Sebagai perlakuan diperlukan monomer MMA (0, 10, 30, 50) µg/ml. Masing-masing perlakuan dilakukan replikasi banyak tiga kali. Setelah dilakukan paparan monomer MMA, sesuai dengan kadar yang telah ditentukan diukur densitas optik pada lama inkubasi 12 jam dan 18 jam.

Analisis OD DNA menggunakan *chelex*, setelah diinkubasi 12 dan 18 jam, suspensi sel ditambahkan PBS 500 µl kemudian diputar dengan kecepatan 6000 rpm selama 1 menit. Pelet sel dicuci kembali dengan PBS 500 µl (kecepatan 6000 rpm selama 1 menit). Pellet sel diambil ditambahkan *Chelex*, kemudian direbus 95° C selama 10 menit untuk memberikan kesempatan DNA terlepas dari *chelex*. Setelah itu didinginkan (lebih kurang 2 menit). Kemudian divortex sebentar. Supernatan diambil (DNA-nya) dan diencerkan sebanyak 50 kali (784 µl aquadest ditambah 16 µl DNA).

Nilai OD DNA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Pada OD tersebut dan pengenceran supernatan (ekstraksi DNA-nya) sebesar 50 kali diperoleh nilai absorpsi 0,198; maka akan diperoleh konsentrasi DNA sebesar $0,198 \times 50\%$ (ng/ μ l) = 495 ng/ μ l. Penelitian dilakukan di Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kontak antara piranti ortodonti lepasan dengan mukosa mulut mencangkup area yang cukup luas. Secara klinis hal tersebut dapat menyebabkan mukosa tersebut terinflamasi, terinfeksi atau terkena trauma. Paparan bahan yang dapat merusak mukosa, baik paparan akut maupun paparan kronis, bisa membahayakan kesehatan mukosa rongga mulut penderita (Baker dkk, 1992; Lefebvre dkk, 1992 & 1995; Zentner dkk, 1994; dan Kedjarune dkk, 1999). Efek ini diperkirakan disebabkan oleh produk toksik baru yang timbul saat polimerisasi atau produk toksik sisa dari reaksi polimerisasi yang tidak sempurna (Baker dkk, 1992; Lefebvre dkk, 1994). Ternyata eluat polimer resin akrilik *cold curing* mengandung bahan yang potensial toksik adalah formaldehid, metil metakrilat, asam metakrilat (Lefebvre dkk, 1991; 1992 & 1994).

Uji kontak langsung dengan mencampurkan monomer MMA dalam media kultur yang digunakan dalam penelitian ini, memungkinkan monomer MMA dapat menyebar dengan cepat di seluruh kultur sel yang memberinya akses cepat dan sebanding ke semua sel-sel. Hasil uji secara *in vitro* ini menunjukkan sitotoksitas MMA ternyata berhubungan dengan gangguan metabolisme sel. Tipe respon ini khususnya sangat penting untuk toksisitas yang bergerak sangat lamban, terutama di jaringan yang mengalami bahaya. Misalnya, penghambatan metabolisme sel-sel melalui pergantian normal sel (Lefebvre dkk, 1992; Kumar dkk, 1997).

Uji *in vitro* dapat dilakukan cukup baik dengan cara menggunakan kontrol, baik terhadap variabel-variabel individual sehingga mampu menentukan mekanisme toksik yang lebih baik. Namun pada uji ini harus dipertimbangkan pula adanya kelemahan-kelemahan, seperti mekanisme penghambat/pereda seperti aliran saliva dan kapasitas bufer tidak dapat dilakukan Freshney, 1994).

Kultur sel yang digunakan untuk penelitian ini dipakai kultur sel fibroblas dari ginjal hamster (BHK-21). Kultur sel BHK-21 digunakan sebagai model uji sitotoksitas dari MMA. Kultur sel tersebut selain mudah didapat juga

mudah untuk penanganannya dan tidak terlalu memerlukan biaya perawatan yang tinggi.

Ekstraksi DNA yang dipakai untuk menentukan OD DNA adalah *celex*. Dipilih *celex* karena mempunyai beberapa kelebihan seperti: mudah pengerjaannya karena tidak memerlukan tahapan yang terlalu panjang (praktis), mempunyai ketepatan tinggi di samping itu murah biayanya (Promega).

Nilai rata-rata dan Simpangan Baku sebagai hasil dari ekstraksi DNA yang ditunjukkan dengan nilai OD DNA dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata dan Simpangan Baku untuk paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA selama 12 jam

No.	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata	SB	Min	Max
1.	0	63,75	12,37	55,00	72,50
2.	10	119,17	7,22	115,00	2750
3.	30	104,17	22,55	82,00	127,50
4.	50	57,50	44,23	117,00	205,00

Simpangan Baku pada Tabel 1, makin besar dengan meningkatnya kadar paparan MMA. Nilai-nilai minimal dan maksimal mempunyai nilai yang tumpang tindih diantara kadar paparan (10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA. Ini menunjukkan bahwa ada kecenderungan OD DNA makin meningkat.

Setelah dilakukan pengukuran OD DNA, kemudian dilakukan analisis varians satu arah, diketahui bahwa ada perbedaan bermakna diantara kadar paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA pada lama paparan 12 jam (Tabel 2).

Tabel 2. Analisis varians satu arah pada paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA selama 12 jam

No.		D.F	Sum of Square	Mean of Square	F Ratio	F Prob
1.	Antar Kelompok	3	11073,7689	3691,2553	4,98	0,037
2.	Diantara Kelompok	7	5186,4583	740,9225		
	Total	10	16260			

Keterangan: db = derajat bebas; uji anova dua arah bermakna bila $p < 0,05$; F = F hitung; Sig F = p = probabilitas $P < \alpha = 0,005$: bermakna

Untuk masing-masing paparan dibedakan dengan analisis varians, bermakna bila F prob lebih kecil dari pada α . Pada tabel di atas p (0,04) lebih kecil dari α (0,05), menunjukkan adanya perbedaan bermakna. Untuk melihat mana yang menunjukkan perbedaan bermakna diantara masing-masing kadar MMA, dilakukan uji kemaknaan dengan Student-Newman-Keuls (SNK).

Tabel 3. Uji komparasi ganda SNK masing-masing paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA pada paparan 12 jam

No.	Kadar	10 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
1.	0	55,42	40,42	93,75*
2.	10	-----	15,50	38,33
3.	30		-----	53,33
4.	50			-----

Tanda bintang menunjukkan adanya perbedaan bermakna.

Sedangkan untuk paparan MMA pada waktu 18 jam mempunyai rata-rata dan Simpangan Baku OD DNA yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata dan Simpangan Baku untuk paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA selama 18 jam

No.	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata	SB	Min	Max
1.	0	57,50	10,61	50,00	65,00
2.	10	104,17	12,33	90,00	112,00
3.	30	120,00	28,17	102,00	152,00
4.	50	131,67	18,43	117,00	152,00

Nilai-nilai minimal dan maksimal mempunyai nilai yang kurang tumpang tindih di antara kadar paparan (10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA. Ini menunjukkan bahwa makin tinggi paparan MMA makin OD DNA makin meningkat dan menunjukkan ada perbedaan.

Hasil pengukuran dengan analisis varians satu arah dari OD DNA pada kadar paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA diketahui bahwa ada perbedaan bermakna pada lama paparan 18 jam.

Tabel 5. Analisis varians satu arah pada paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA selama 18 jam

No.		D.F	Sum Of Square	Mean Of Square	F Ratio	F Prob
1.	Antar Kelompok	3	7254,1667	2418,0556	5,3080	0,0212
2.	Diantara Kelompok	7	2683,3333	383,3333		
	Total	10	16260			

Keterangan: db = derajat bebas; uji anova dua arah bermakna bila $p < 0,05$; F = F hitung; Sig F = p = probabilitas $P < \alpha = 0,05$: bermakna

Masing-masing paparan pada waktu inkubasi 18 jam setelah dilakukan analisis varians, menunjukkan adanya perbedaan bermakna karena p (0,02) lebih kecil dari α (0,05). Kemudian dilanjutkan dengan uji kemaknaan dengan menggunakan SNK (Tabel 6).

Tabel 6. Uji kemaknaan masing-masing paparan (0, 10, 30, 50) $\mu\text{g/ml}$ MMA pada paparan 18 jam.

No.	Kadar	10 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
1.	0	46,67	62,5	74,17*
2.	10	-----	15,83	27,5*
3.	30		-----	11,67*
4.	50			----

Tanda bintang menunjukkan adanya perbedaan bermakna

Masing-masing paparan pada waktu inkubasi 18 jam setelah dilakukan analisis varians, menunjukkan adanya perbedaan bermakna karena p (0,02) lebih kecil dari α (0,05). Kemudian dilanjutkan dengan uji kemaknaan dengan menggunakan SNK (Tabel 6.).

Proses mitosis atau multiplikasi dari sel tergantung dari gen yang mengatur dalam proses mitosis. Sel dapat tumbuh tidak normal (berlebihan) maka akan terjadi proses multiplikasi yang berlebihan juga oleh karena tidak ada inhibisi kontak lagi. Beberapa induktor yang dapat menginduksi fosforilasi pada tahap transkripsi DNA adalah: sinar ultraviolet, faktor pertumbuhan, cAMP, ion Kalsium, Phorbol ester, dan garam logam berat, dan panas (hitshock) (Knippers S, 1997).

Pengaktifan gen melalui fosforilasi dapat mempengaruhi fungsi dari urutan nukleotida promotor. Gen yang meregulasi terjadinya fosforilasi/proliferasi pada hewan ditentukan oleh: c-Fos-Gen yang mengandung TATA BOX yang merupakan signal awal dari terjadinya transkripsi (Knippers S, 1997).

Dari hasil analisis keseluruhan dengan menggunakan anova diperoleh kesimpulan bahwa berbagai kadar paparan MMA pada waktu paparan 12 dan 18 jam berpengaruh terhadap OD DNA dari kultur sel. Sedangkan berapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pengaruh sitotoksitas MMA dapat menurunkan OD DNA kultur sel.

Hal ini justru menjadi pertanyaan mengapa hasil penelitian berbeda dengan penelitian terdahulu. Kemungkinan yang paling mungkin terjadi adalah pengaruh MMA terhadap fosforilasi, dimana merupakan tahapan penting dimana gen yang mengatur untuk awal terjadinya transkripsi. Dengan demikian sintesis DNA justru akan terpicu. Hal yang perlu dikawatirkan dalam hal ini adalah sintesis DNA yang tidak terkontrol.

Dari hasil keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh sitotoksitas monomer MMA pada kultur sel fibroblast BHK-21 dapat meningkatkan sintesis DNA kultur sel BHK-21, hal ini ditunjukkan adanya peningkatan nilai OD DNA. Peningkatan sintesis DNA mungkin disebabkan oleh induksi monomer MMA terhadap gen pengendali C-Fos-Gen sehingga terjadi fosforilasi.

Diharapkan dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana MMA dapat menginduksi gen pengendali C-Fos-Gen sehingga fosforilasi dapat terjadi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. 1994. *Molecular Biology Of The Cell*, 3rd ed. New York-London Garland Publishing Inc. pp 155-253.
- Anusavice KJ. 1996. *Phillip's Science Of Dental Material*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, pp 75-80 and 250 -252.
- Asabe S, Tanji Y, Satoni S, Kaneko T, Kimura K. 1997. The N-Terminal Region of Hepatitis C Virus-Encoded NS5A Is Important for NS4A-Dependent Phosphorylation. *J. Virol* 71: 790-796.
- Baker S, Brooks SC, and Walker DM. 1988. The Release Of Residual Monomeric Methyl Methacrylate From Acrylic Appliance In Human Mouth: An Assay For Monomer In Saliva. *J Dent Res* 67: 1295-1299.
- Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, and Lefebvre CA. 1993. Biocompatibility Of Visible Light-polymerized Denture Base Resins. *Int J Prosthodont* 6: 495-501.
- Combe EC. 1992. *Notes And Dental Material*. 6th ed. Edinburg London New York: Churchill Livingstone, pp 26-31.

- Freshney RI. 1994. Culture Of Animal Cells. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, pp 133-135.
- Gass M, Harrold BA, and Tate M, 1997. Pathobiology An Introduction. Saint Louis CV Mosby Co. pp 184-206.
- Gilbert HF. 1992. Basic Concept in Biochemistry: A Student's Survival Guide. New York Sydney: MacGraw-Hill Inc. Health Profession Division, pp143-151.
- Knippers R. 1997. Molekulare Genetik. Stuttgart-New York Georg Thieme Verlag. Pp 329-378.
- Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, and Bartram CR, 2000. Molekulare Medizin. Berlin-New York Walter de Gruyter. pp 49-62.
- Kumar V, Cotran R, and Robbins S. 1997. Basic Pathology. 6th edition. Canada - Toronto WB Saunders Co. pp 47-59.
- Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, and Caughman WF. 1991. Effects Of Denture Base Resin On Oral Epithelial Cells. *Int J Prosthodont* 4: 371-376.
- Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW, and Barron DJ. 1992. The Cytotoxic Effects Of Denture Base Resin Sealants. *Int J Prosthodont* 5: 558-562.
- Lefebvre CA, Knoerschild KL, and Schuster GS. 1994. Cytotoxicity Of Eluates From Light-polymerized Denture Base Resins. *J Prosthet Dent* 72: 644-650.
- Lehninger AL, Nelson DL, and Cox MM. 1993. Principles Of Biochemistry. 2nd ed. New York: Worth Publishers, pp 543-593.
- Mac Cabe JF. 1992. Anderson's Applied Dental Material. 7th ed. London: Blackwell Scientific Publication, pp 79-85.
- Préhand C, Nel K, and Bishop DHL. 1992. Baculovirus-Expressed Rabies M1 Protein is not Phosphorilated: It Forms Multiple Complexes With Expressed Rabies N Protein. *Virology* 189: 766-770.
- Surjo, 1994. Genetika Manusia. Yogyakarta Gajah Mada University Press. Hal 57-82.
- Wahju A IGA. 1998. Toksisitas Resin Akrilik. *Cold Curing Di Bidang Ortodonti. Maj. Kedok.Gigi (Dent.J.)* Surabaya 31: 44-47.
- Wahju A IGA, Djokosalomoen S, dan Tjandra IP. 1999. Biokompatibilitas Akrilik Jenis *Cold Curing* Tanpa Dan Dengan Polyklaf (Dentaurum) Pada Tekanan 2 Atmosfir. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
- Vallitu PK, Mietenen V, and Alakuijala P. 1995. Residual Monomer Content And Its Release Into Water From Denture Base Materials. *Dent Mater*, 11: 338-342.
- Zentner MA, Serogl HG, and Kretschmer A. 1994. An In-vitro Study Of Resins Used In Orthodontics For Their Cell Toxicity. *Fortschr-Kieferorthop* 55: 311-318.
- Zografakis MA, Harrison A, and Huggett R. 1994. Measurement Of Residual Monomer In Denture Base Material: Studies On Variations In Methodology Using Gas-liquid Chromatography. *Eur J Prothodont Restor Dent* 2: 101-107.