

SITOTOKSISITAS *NON DENTAL GLASS FIBER REINFORCED COMPOSITE* TERHADAP SEL FIBROBLAS METODE *METHYL TETRAZOLIUM TEST*

Dendy Murdiyanto

Staf pengajar, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
dendymurdiyanto@gmail.com

ABSTRAK

Perawatan di kedokteran gigi mulai menggunakan material *fiber reinforced composite* (FRC) sebagai bahan penyusun alat-alat tertentu seperti gigi tiruan cekat, restorasi *onlay*, *splinting* gigi goyah, pasak gigi dan *space maintainer*. Penyusun FRC terdiri dari *fiber* dengan jenis terbanyak *glass fiber* dan matriks berupa *dental composite*. *Non dental glass fiber* merupakan jenis *glass fiber* yang digunakan pada pembuatan gypsum, patung dan alat-alat otomotif yang mudah dijumpai di pasaran dengan harga terjangkau. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi sitotoksitas *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sel fibroblas yang mati.

Penelitian ini menggunakan FRC yang diperkuat oleh *non dental glass fiber* yang telah dianalisa komposisinya dengan *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX). Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode *methyl tetrazolium test* (MTT) menggunakan sel Vero terhadap air hasil rendaman FRC selama 1, 4 dan 7 hari masing-masing 6 pengulangan sampel tiap kelompok. Jumlah sel yang mati menunjukkan tingkat sitotoksitas dan kemudian dianalisa dengan uji Anava satu jalur ($\alpha = 0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kematian sel tertinggi yaitu $8,50 \pm 0,34$ % pada lama perendaman 4 dan 7 hari, sedangkan rata-rata kematian sel terendah yaitu $8,49 \pm 0,35$ % pada lama perendaman 1 hari. Berdasarkan pedoman dari Sjögren bahan tidak bersifat sitotoksis jika kematian sel masih dibawah 10%. Uji Anava satu jalur diperoleh $p > 0,05$ pada lama perendaman 1, 4 dan 7 hari. Kesimpulan hasil penelitian yaitu tidak terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas yang mati pada lama perendaman 1, 4 dan 7 hari. *Non dental glass fiber reinforced composite* tidak bersifat sitotoksis terhadap sel fibroblas.

Kata kunci : *glass fiber, fiber reinforced composite, sitotoksitas*

ABSTRACT

Fiber reinforced composite (FRC) is a commonly agent used in dental treatment, and its function as a filler material for certain appliance compilers include fixed artificial tooth, onlay, splinting, tooth dowel and space maintainer. FRC is mainly consisted from fiber with glass fiber and dental composite matrix. Non dental glass fiber is a glass fiber type used at gypsum processing and otomotif appliances which is easy to be found at global market with reasonable price. The aim of study was to examine the cytotoxicity effect of type and duration of immersion non dental glass fiber reinforced composite on a fibroblast cell line.

The research used FRC reinforced types of non dental glass fiber that analized by scanning electron microscope – energy dispersive x-ray (SEM-EDX). Cytotoxicity test using Vero cells

incubated with water immersion of FRC for 1, 4, and 7 days was confirmed by MTT assay. Research was done in 6 replications. Statistic analysis was delivered by SPSS 17.0. Data was analyzed by one-way Anova with level of significance 95%.

Result of study was showed highly cell death $8,50 \pm 0,34$ % on 4 and 7 days immersion. Inversely, $8,49 \pm 0,35$ % with 1 day immersion duration was detected at lower cell death level. According to Sjorgen that was not cytotoxic material if the dead cell lower than 10%. Statistical analysis show that $p > 0,05$ on 1, 4 and 7 days duration of immersion. In conclusion, there is not significant difference fibroblast cell line death on 1,4 and 7 days. Non dental glass fiber reinforced composite was not cytotoxic on fibroblast cell line.

Key word: glass fiber, fiber reinforced composite, cytotoxicity

PENDAHULUAN

Fiber reinforced composite adalah suatu komposit yang didalamnya sudah diperkuat oleh fiber¹. Perawatan di kedokteran gigi mulai menggunakan material FRC sebagai bahan penyusun alat-alat tertentu. Penggunaan FRC di kedokteran gigi antara lain pada gigi tiruan cekat², restorasi onlay³, splinting gigi goyah, pasak gigi dan space maintainer⁴. Tujuan digunakannya FRC pada perawatan di kedokteran gigi yaitu untuk mendapatkan kekuatan yang lebih baik⁵.

Komposisi kimia dari E-glass fiber yang sering dipakai di kedokteran gigi yaitu SiO₂ 54 %, Al₂O₃ 14 %, CaO + MgO 22 %, B₂O₃ 10 % dan Na₂O + K₂O kurang dari 2 %⁶. E-glass fiber untuk perawatan kedokteran gigi di Indonesia masih jarang dijumpai dan harganya relative mahal. Namun demikian di Indonesia tersedia glass fiber di banyak tempat dengan harga terjangkau yang digunakan di dunia teknik sebagai penguat pada pembuatan gypsum, patung dan alat-alat otomotif. Uji scanning electron microscope – energy dispersive x-ray (SEM-EDX) pra penelitian yang telah dilakukan untuk melihat komposisi dari bahan tersebut, ternyata didapat hasil bahwa sebagian besar komposisinya sama dengan E-glass fiber yang biasa digunakan di kedokteran gigi, meskipun ada beberapa komponen penyusun yang berbeda.

Alat dan bahan medis yang digunakan pada perawatan pasien harus memenuhi persyaratan international organization for standardization (ISO) 10933 termasuk di bidang kedokteran gigi. Prinsip uji biokompatibilitas merupakan bagian ISO 10933⁷. Uji sitotoksitas bagian dari ISO 10933-5 merupakan langkah awal untuk mengetahui biokompatibilitas suatu material, seharusnya material tidak mempengaruhi pertumbuhan, integritas dinding, aktivitas, integritas genetik dan ekspresi genetik dari sel⁸.

Uji sitotoksitas yang sering dilakukan diantaranya dye exclusion, colony-forming assay, intracellular energy charge, dan methyl tetrazolium test (MTT)⁹. Kelebihan dari prosedur MTT adalah hasil yang akurat, lebih menghemat waktu, dan dapat digunakan pada semua jenis sel termasuk sel fibroblas¹⁰.

Lingkungan rongga mulut tempat aplikasi FRC memiliki kandungan air yang berasal dari saliva dan cairan lain¹¹. Saat resin komposit terpapar air, terjadi efek yang merugikan. Air dapat menghancurkan ikatan matriks polimer-fiber dan dapat mempengaruhi sifat sitotoksitas karena akan menyebabkan komponen penyusun FRC terlepas serta larut^{12,13}. Örtengren menyebutkan bahwa konsentrasi lepasan penyusun komposit dalam air akan meningkat sebanding dengan lama perendaman¹⁴.

METODE PENELITIAN

1. Bahan

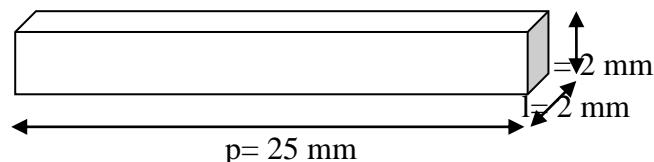
Bahan penelitian yang digunakan adalah sel Vero (LPPT UGM), *Flowable composite* (Master flow Biodinamica, Brazil), *Silane coupling agent* (3M ESPE™Sil, Jerman) dan *glass fiber*. Uji *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX) pra penelitian yang telah dilakukan untuk melihat komposisi *fiber* dengan hasil pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi *non dental glass fiber* (%)

Komponen	%
C	3,64
O	59,90
Mg	1,25
Al	2,03
Si	20,15
K	0,20
Ca	6,87
Na	5,93
Ti	-
Zr	-
Cu	-

2. Metode

Fiber disimpan di dalam *dessicator* selama 24 jam selanjutnya dipotong sepanjang 25 mm. Setiap *fiber* yang sudah dipotong dan ditimbang selanjutnya ditetesi *silane* 1 ml. Cetakan logam dengan ukuran 25 x 2 x 2 mm diletakkan di atas *glass plate*¹⁵. Komposit resin diinjeksikan sampai terisi setengah dari tinggi mould, kemudian dimasukkan ke dalam cetakan dengan arah sejajar sumbu aksis dan ditambahkan lagi di atas *fiber* hingga seluruh permukaan *fiber* tertutup dan *mould* terisi penuh lalu ditutup dengan *glass plate*. Penyinaran dilakukan dengan menggunakan *visible light curing* selama 4 x 20 detik untuk tiap permukaan, permukaan yang tidak disinari ditutup dengan *aluminium foil*. Setelah penyinaran selesai, sampel dikeluarkan dari cetakan (gambar 1). Sampel direndam dalam *saline* sebanyak 10 ml selama 1, 4, 7, dan 10 hari kemudian disimpan pada inkubator suhu 37°C dengan kondisi steril. Air hasil rendaman sampel selanjutnya disentrifusi dan ditambahkan ke dalam media kultur.



Gambar 1. Bentuk dan ukuran sampel

Penghitungan sel Vero dilakukan apabila sel telah konfluen dalam *flask*, menempel, dan tumbuh memenuhi dasar *flask* kemudian dilakukan pengenceran untuk membuat suspensi dengan kepadatan 2×10^4 sel/100 μL . Setiap sumuran pada 96 sumuran *microtiter tissue plate* diisi suspensi sel fibroblas. Kultur sel diinkubasi selama 24 jam. Paparan sampel penelitian sebanyak 1 mL diberikan pada kultur sel. Suspensi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Tiap sumuran diberi 10 μL MTT (5 mg/ml), dibiarkan 4 jam kemudian dibuang lalu diberi 100 μL DMSO. Pada uji MTT, nilai *optical density* (OD) diperoleh dari penghitungan terhadap jumlah formazan yang terbentuk menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Nilai OD digunakan untuk menghitung persentase sel yang mati menggunakan rumus ⁷ :

$$\text{Sel mati \%} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD perlakuan}}{\text{OD kontrol}} \times 100\%$$

Data pengaruh jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sitotoksitas sel fibroblas diuji dengan statistik Anova dua jalur dengan $\alpha = 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

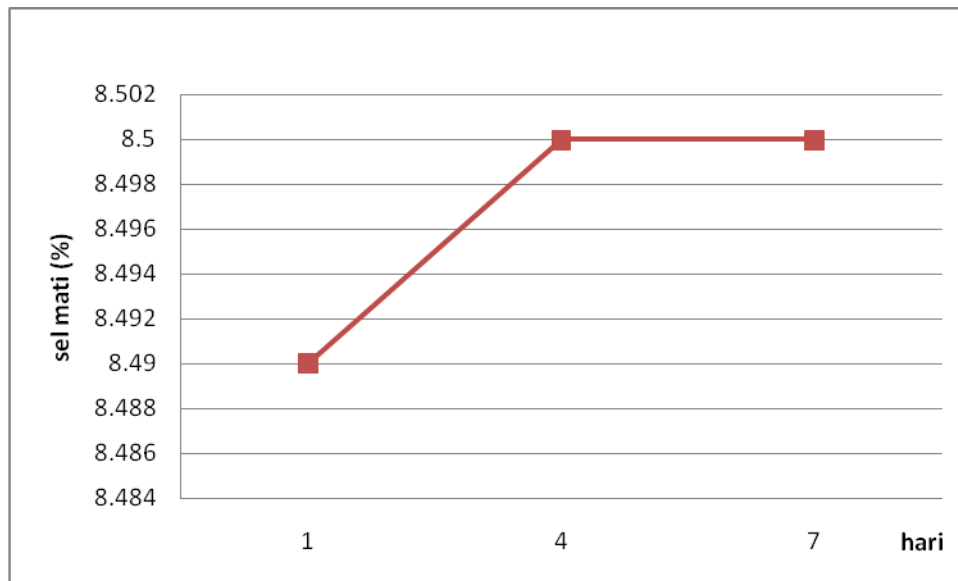
A. Hasil

Penelitian sitotoksitas *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sel fibroblas metode *methyl tetrazolium test* telah selesai dilaksanakan. Nilai rerata dan simpangan baku dari sel yang mati setelah pemaparan air hasil perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* selama 1, 4 dan 7 hari dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Tabel hasil rerata dan simpangan baku dari sel yang mati

Lama perendaman (hari)	Hasil		
	rata-rata sel mati (%)	±	SD
1	8.49	±	0.35
4	8.50	±	0.34
7	8.50	±	0.34

Jumlah sel yang mati setelah dipaparkan air hasil rendaman *non dental glass fiber reinforced composite* mengalami kenaikan jumlah seiring dengan lama perendaman. Lama perendaman terhadap sel mati untuk FRC bisa dilihat pada grafik gambar 2. Data rata-rata jumlah sel yang mati masih termasuk dalam sebaran normal berdasarkan uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* ($p > 0,05$) dan memiliki tingkat homogen $p > 0,05$ pada uji *Levene*.



Gambar 2. Grafik hari perendaman terhadap sel mati

Hasil olah data Anova satu jalur dengan variabel *independent* lama perendaman sedangkan variabel *dependent* persentase sel fibroblas yang mati diperoleh kesimpulan (Tabel 3) bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas yang mati pada lama perendaman 1, 4 dan 7 hari dengan nilai $p > 0,05$.

Tabel 3. Hasil uji Anava satu jalur

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,000	2	0,000	0,001	0,999
Within Groups	1,787	15	0,119		
Total	1,787	17			

B. Pembahasan

Sifat biologis dan toksisitas suatu material merupakan hal yang penting dalam perawatan kedokteran gigi. Penilaian sitotoksitas secara *in vitro* merupakan tahap yang harus dilalui sebelum tahap *in vivo*¹³. Beberapa peneliti telah melaporkan nilai sitotoksitas FRC yang bervariasi terhadap beberapa sel termasuk jenis sel fibroblas¹⁷. Sel fibroblas yang digunakan pada penelitian pengaruh jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sitotoksitas sel fibroblas yang telah dilakukan adalah sel Vero dari LPPT UGM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase rata-rata jumlah sel yang mati bervariasi dari 8,48% - 8,55% masih dibawah 10%. Pedoman sitotoksitas suatu bahan bahwa suatu material dikatakan tidak sitotoksik jika sel hidup lebih dari 90% atau sel mati kurang dari 10% dan termasuk sitotoksik ringan jika sel hidup 60-90% atau sel mati 10-40%¹⁶. Nilai ini juga sesuai dengan ISO 10993 yang menyatakan bahan termasuk sitotoksik jika viabilitas sel kurang dari 70% atau sel mati lebih dari 30%. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa jenis *non dental glass fiber reinforced composites* tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas.

Jumlah sel Vero yang menurun kemungkinan disebabkan karena kontak dengan komponen FRC yang larut di dalam air. Silika merupakan komponen anorganik dengan jumlah terbanyak yang

diuji dengan *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX), selain itu matriks FRC berupa *composite flowable* juga mengandung *filler* silika. FRC yang berkontak dengan air akan menyebabkan difusi air ke dalam FRC diantara *polymer network* dan berada diantara celah *microvoid* sehingga terjadi plastisasi dan pembengkakan matriks polimer¹⁸.

Menurut Mallick bahwa *silica glass fiber* yang sering digunakan di dalam kedokteran gigi memiliki komposisi silika dalam bentuk SiO₂. Wegner pada penelitiannya menyebutkan bahwa terdapat penurunan jumlah sel fibroblas namun tidak signifikan dan silika dalam bentuk SiO₂ tidak bersifat sitotoksik¹⁹. Kematian sel fibroblas kemungkinan disebabkan karena sebagian silika yang berukuran kecil dapat menembus dinding sel dan berada di sitoplasma sebagai residu yang mengganggu metabolisme²⁰.

Jumlah kematian sel fibroblas penelitian pada sampel menunjukkan peningkatan, pada hari ke-4 sampai 7. Hal ini sesuai dengan pendapat Ferracane bahwa *hydrolytic* bisa dilihat selama 7-60 hari²¹. Kematian sel terjadi karena akumulasi komponen penyusun FRC yang terlarut. Banyaknya penyusun FRC yang terlarut tidak bisa disamakan dengan jumlah air yang masuk ke FRC karena kecepatan difusi air dan larutnya komponen tidak berbanding lurus. Air diserap lebih cepat daripada komponen terlarut yang lepas sampai mendekati kejenuhan²². Ikatan oleh silane yang baik antara matriks dengan fiber juga menyebabkan penyerapan air menjadi lebih sedikit sehingga komponen penyusun FRC yang terlarut juga akan kecil.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa :

1. Tidak terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas yang mati pada lama perendaman 1, 4 dan 7 hari.
2. *Non dental glass fiber reinforced composite* tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas.

B. Saran

1. Penelitian ini menggunakan satu jenis *non dental glass fiber* sehingga masih perlu dibandingkan dengan jenis fiber lain.
2. Penelitian ini masih merupakan penelitian sitotoksisitas awal terhadap material *non dental glass fiber* menggunakan sel fibroblas sehingga masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tingkat *in vivo* dengan hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bunsell A.R. dan Renard J., *Fundamentals of Fibre Reinforced Composite Materials*, Institute of Physics Publishing, Bristol, 2005, hal. 23-25.
2. Mohan S., Gurtu A., Singhal A., dan Guha C., Fibre Reinforced Composite – A Rivew and Case Report, *J. Dent. Sci. Oral Rehab.*, 2012, 5 : 45-48.
3. Garoushi S., Mangoush E., Vallittu P., dan Lassila L., Short Fiber Reinforced Composite: a New Alternative for Direct Onlay Restorations, *Open Dent. J.*, 2013 , 7 : 181-185.
4. Tuloglu N., Bayrak S., dan Tunc E.S., Different Clinical Applications of Bondable Reinforcement Ribbond in Pediatric Dentistry, *Eur. J. Dent.*, 2009, 3 : 329-334.

5. Duymus Z.Y., Karaalioglu F.O., dan Suleyman F., Flexural Strength of Provisional Crown and Fixed Partial Denture Resins both with and without Reinforced Fiber, *J. Mater. Sci. Nanotechnol.*, 2014, 1 (3): 302.
6. Mallick P.K., *Fiber-Reinforced Composites: Materials, Manufacturing, and Design*, 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008, hal 19-63.
7. ISO 10993-5, *Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5, Test For In Vitro Cytotoxicity*, 2009, hal. 30-34.
8. O'Brien W.J., *Dental Materials and Their Selection*, 3rd ed, Quintessence Publishing Co, Inc, Canada, 2002, hal. 12.
9. Portner, R., *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, 2nd ed., Humana Press Inc., New Jersey, 2007, hal. 212-214.
10. Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., dan Tuor, U., The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities, *App Environmen Microbiol*, 1999, 65(8): 3727-3729.
11. Kuroda, S., Yokoyama, D., Shinya, A., Gomi, H., dan Shinya, A., Measuring The Effects of Water Immertion Conditions on The Durability of Fiber-Reinforced Hybrid Composite Resin Using Static and Dynamic Tests. *Dent. Mat. J.*, 2012, 31(3) : 449-457.
12. Raszewski, Z., dan Nowakowska, D., Mechanical Properties of Hot Curing Acrylic Resin after Reinforced with Different Kinds Of Fibers, *Int. J. Biomedic. Mat. Res.*, 2013, 1(1) : 9-13.
13. Powers J.M. dan Sakaguchi R.L., *Craig's Restorative Dental Material*, 12th ed., Mosby Elsevier, St. Louis, 2006, hal. 104.
14. Örtengren U., Wellendorf H., Karlsson S., dan Ruyter IE, Water Sorption and Solubility of Dental Composites and Identification of Monomer Released in Aquaaous Environment, *J. Oral Rehab.*, 2001, 28:1106-1115.
15. ISO 4049, *Dentistry – Polymer-Based Filling, Restorative and Luting Materials*, 2000, hal 17-20.
16. Sjögren G., Sletten G., dan Dahl J.E., Cytotoxicity of Dental Alloys, Metals, and Ceramics Assessed by Millipore Filter, Agar Overlay, and MTT Test, *J. Prosthet. Dent.*, 2000, 84(2): 229-36.
17. Andrade A.L.,Marco R.M., Maia T., Lopes M.T.P., Salas C.E. dan Domingues,Z.R., In Vitro Bioactivity And Cytotoxicity Of Chemically Treated Glass Fibers, 2004, *Mat. Res.* , 2004,7(4) : 635-638.
18. Curtis A.R., Shortall A.C., Marquis P.M., dan Palin W.M., Water Uptake and Strength Characteristics of A Nanofilled Resin-Based Composite, *J. Dent.*, 2008, 36(3): 186–93.
19. Wagner S., Münzer S., Behrens P., Scheper T., Bahnemann D., dan Kasper C., Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles, *Journal of Physics*, 2009, 12: 1-8.
20. Kostroyz E.L., Utter C.J., Wang Y., Dusevic V. and Spencer P., Cytotoxicity of Dental Nanocomposite Particles, *NSTI-Nanotech*, 2007, 2:647-650.
21. Noort R.V., *Introduction to Dental Materials*, 3rd ed., Mosby Elsevier, St. Louis, 2007, hal. 63.
22. Zhang M. dan Matinlinna J.P., The Effect of Resin Matrix Composition on Mechanical Properties of E-glass Fibre-Reinforced Composite for Dental Use, *J. Adhesion Sci. and Tech.*, 2011, 19(25): 2687-2701.