

## Research Report

**Eksresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 setelah aplikasi dentin bonding berbasis HEMA****(MMP-1 and TGF- $\beta$ 1 expression after application dentin bonding based on HEMA)**Adioro Soetojo<sup>1</sup>Mulia Rahmah<sup>2</sup>, Ari Subiyanto<sup>1</sup>, M. Mudjiono<sup>1</sup><sup>1</sup> Staf Pengajar Bagian Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga<sup>2</sup> PPDGS, Bagian Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga**ABSTRAK**

**Background:** Dentin bonding adalah bahan untuk melekatkan resin komposit terhadap dentin. Komponen utama penyusun dentin bonding adalah *2-hydroxyethyl methacrylate* (HEMA). Setelah polimerisasi, terdapat monomer sisa yang akan berdifusi ke dalam tubuli dentin sampai ke dalam pulpa yang dapat mempengaruhi sel odontoblas. **Objective:** Menganalisis ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 pada dentin gigi tikus yang diberikan dentin bonding HEMA dan HEMA murni. **Methods:** Gigi molar pertama rahang atas tikus wistar dipreparasi klas 1 tanpa aplikasi bahan selama 3 hari (kelompok 1), kemudian diaplikasikan HEMA murni selama 3 hari (kelompok 2), dentin bonding HEMA selama 3 hari (kelompok 3). Kemudian gigi ditumpat dengan Fuji II LC. Tikus wistar di dekaputasi dan rahangnya direseksi pada hari ke 3 kemudian diproses untuk pemeriksaan histokimia. **Result:** Ekspresi MMP-1 pada penggunaan dentin bonding HEMA lebih sedikit dibandingkan dengan HEMA murni, ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada penggunaan dentin bonding lebih banyak dibandingkan dengan HEMA murni. **Conclusion :** Ada perbedaan bermakna pada ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 antara penggunaan dentin bonding HEMA dibandingkan dengan HEMA murni

Keyword : Dentin bonding, HEMA, MMP-1, TGF- $\beta$ 1

**Correspondence :** Adioro Soetojo, Lecture of Departement Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Airlangga University, Surabaya – Indonesia. Email : adioro-s@fkg.unair.ac.id

**Pendahuluan**

Komposit merupakan salah satu pilihan restorasi estetik yang membutuhkan bahan adesif untuk melekatkan resin komposit terhadap struktur gigi baik enamel maupun dentin. Pada restorasi kavitas klas V yang didominasi oleh permukaannya berupa dentin dibutuhkan suatu bahan adesif berupa dentin bonding untuk melekatkan resin komposit terhadap dentin.<sup>1</sup> Komponen utama penyusun dentin bonding adalah *2-hydroxyethyl methacrylate* (HEMA). HEMA terdiri atas kelompok fungsional hidrofilik dan hidrofobik yang membentuk lapisan

permukaan antara kolagen dentin yang bersifat hidrofilik dan bahan resin yang bersifat hidrofobik. HEMA merupakan monomer metakrilat yang berdifusi ke dalam dentin setelah dilakukan tindakan etsa. Penetrasi tersebut akan membentuk zone dentin yang terinfiltrasi resin yang disebut *hybrid layer*. Penggunaan resin monomer HEMA dianggap dapat meningkatkan perlekatan komposit terhadap dentin.<sup>2</sup>

HEMA mempunyai berat molekul yang rendah sehingga lebih mudah berdifusi melalui tubuli dentin dan akan mempengaruhi sel odontoblas.<sup>2</sup> Ketika dentin bonding diaplikasikan pada dentin,

monomer sisa yang dilepaskan berdifusi ke dalam tubuli dentin sampai ke dalam pulpa. Menurut Kitamura *et al*, difusi monomer sisa HEMA pada dentin dan pulpa dapat mengakibatkan iritasi pulpa.

Beberapa penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa komponen resin monomer sisa dapat menyebabkan respon inflamasi kronik.<sup>3</sup> Respon inflamasi kronik berhubungan langsung dengan pengaruh dari komponen yang terdapat pada bahan bonding. Akumulasi komponennya di dalam pulpa selama prosedurnya dapat menimbulkan reaksi persisten.<sup>4</sup>

Pada kompleks dentin pulpa terdapat sel odontoblas berperan dalam pembentukan dentin dan berperan dalam respon imun. Pada keadaan normal, TGF- $\beta$ 1 disekresi oleh sel odontoblas dan dapat meningkat pada keadaan pulpitis. TGF- $\beta$ 1 penting dalam dentinogenesis dan reparatif sebab menginduksi sekresi MMP-1 dan mineralisasi dentin (Habn *et al.*, 2007)<sup>5</sup>. Odontoblas berfungsi mensintesis berbagai komponen matriks organik dentin terutama kolagen tipe 1. Odontoblas dapat menghasilkan substansi-substansi bioaktif seperti TGF- $\beta$ 1, MMP-1 dan molekul lain yang terlibat dalam proses inflamasi dan perbaikan.<sup>6</sup>

Berdasarkan pertimbangan tersebut maka perlu dilakukan penelitian dengan melihat ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 pada sel odontoblas setelah penggunaan dentin bonding yang berbasis HEMA.

## MATERIAL AND METODE

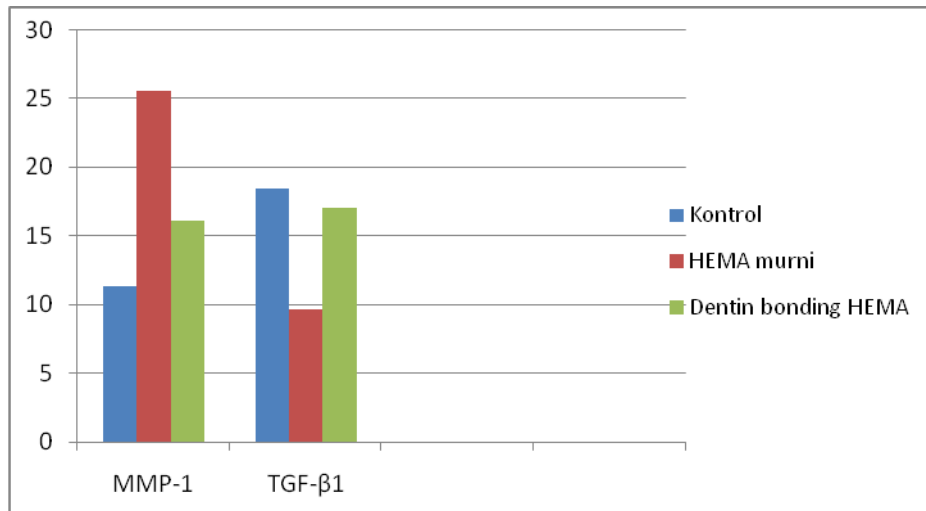
Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian. Rancangan penelitian ini adalah *post-test only group design*. Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan pembuatan Laik Etik oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 sel odontoblas setelah penggunaan dentin

bonding HEMA. Penelitian ini menggunakan sampel 27 tikus wistar jantan, berumur 3-4 bulan yang diperoleh dari laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Tikus wistar diberi makanan dan minuman standar ad libitum. Terdapat tiga kelompok perlakuan yaitu P1, P2, and P3, setiap kelompok terdiri atas 9 ekor tikus. Sebelum diberikan perlakuan, tikus dianestesi secara intraperitoneal menggunakan ketamin (65mg/kg BB). Gigi molar rahang atas tikus dipreparasi menggunakan bur metal. Kelompok pertama sebagai kontrol (P1), hanya dilakukan preparasi kavitas, kelompok kedua (P2) diaplikasikan HEMA 10 %, dan kelompok ketiga (P3) diaplikasikan dentin bonding HEMA (Single Bond, 3M ESPE) dan dipolimerisasi *light cure* selama 20 detik. Kavitas ditutup menggunakan RMGIC (FUJI II GIC). Tikus didekapitasi pada hari ke 3 setelah perlakuan. Rahang atas di reseksi dan direndam dalam larutan buffered 10 % formalin. Selanjutnya proses dekalsifikasi menggunakan EDTA 10 % (ethylene diamine tetra acetic acid). Selanjutnya, sampel di dehidrasi menggunakan etanol dengan konsentrasi bertingkat dan proses *embedding* dalam *paraffin wax*. Pematangan jaringan dengan ketebalan 5 - 8  $\mu$ m menggunakan mikrotom yang diletakkan pada *coated slides*. Ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 sel odontoblas dapat diamati dengan metode imunohistokimia.

## HASIL

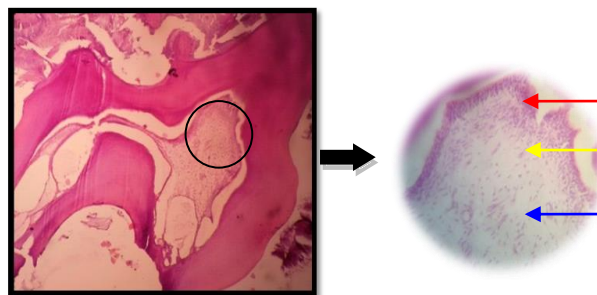
Pengamatan ekspresi MMP-1 dan TGF- $\beta$ 1 menggunakan mikroskop pembesaran 400 kali dengan tiga kali lapang pandang. Data yang diperoleh merupakan hasil pengamatan secara histologi dari setiap ekor tikus pada setiap kelompok. Pada semua kelompok, jumlah ekspresi MMP-1 paling banyak pada kelompok HEMA murni dan jumlah ekspresi TGF- $\beta$ 1 paling banyak pada kelompok kontrol (Gambar 1).



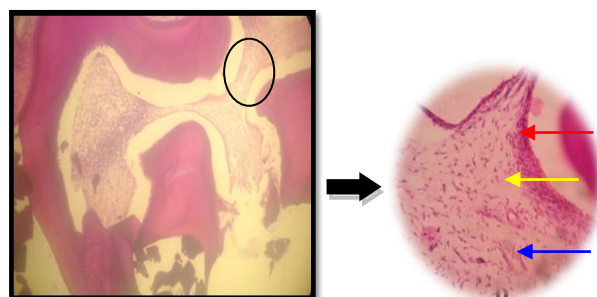
**Gambar 1. Diagram Batang Rerata Jumlah Ekspresi MMP-1 dan TGF-β1**

Hasil pemeriksaan hematosiklin-eosin menunjukkan letak sel odontoblas dalam struktur kompleks dentin pulpa pada kelompok kontrol (gambar 2), kelompok HEMA (gambar 3), kelompok dentin bonding (gambar 4). Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi MMP-1 (gambar 4) dan ekspresi TGF-β1 (gambar 6)

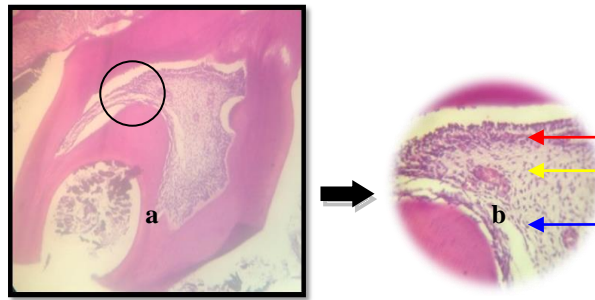
ditandai dengan pewarnaan coklat pada sitoplasma. Semakin kuat intensitas warna coklat berarti semakin kuat ekspresi MMP-1 dan TGF-β1. Perhitungan mean hasil pengamatan setiap sampel dan pengujian statistik dilakukan untuk melihat perbedaan antar kelompok (tabel 1 dan 2)



Gambar 2. Histopatologi sel sel odontoblas setelah preparasi kavitas dengan pembesaran 200X (a) dan 400X (b) pada pewarnaan hematosiklin-eosin (tanda panah). merah : sel odontoblas, kuning : cell free zone, biru : cell rich zone



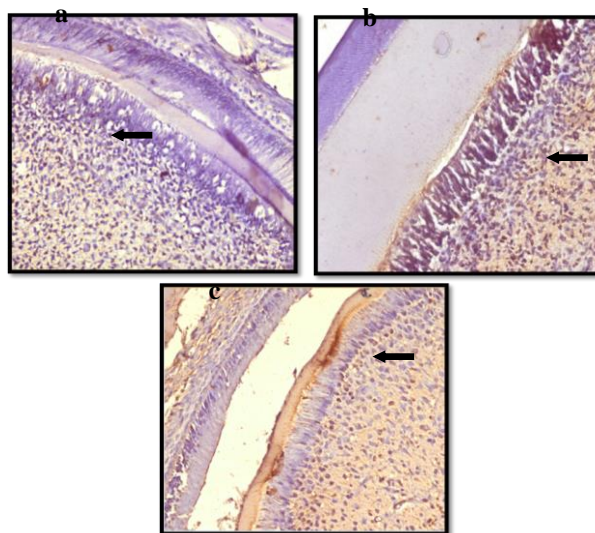
Gambar 3. Histopatologi sel sel odontoblas setelah aplikasi HEMA murni dengan pembesaran 200X (a) dan 400X (b) pada pewarnaan hematosiklin-eosin. merah : sel odontoblas, kuning : cell free zone, biru : cell rich zone



Gambar 4. Histopatologi sel sel odontoblas setelah aplikasi Dentin bonding HEMA dengan pembesaran 200X (a) dan 400X (b) pada pewarnaan hematosiklin-eosin. merah : sel odontoblas, kuning : cell free zone, biru: cell rich zone

Hasil pemeriksaan histologi dengan pengecatan imunohistokimia pada kompleks dentin-pulpa setelah dilakukan preparasi kavitas, aplikasi HEMA murni

dan dentin bonding HEMA menunjukkan ekpresi MMP-1 paling banyak ditemukan pada kelompok B (HEMA murni).



Gambar 5. Ekspresi MMP-1 sel-sel odontoblas pada pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi MMP-1 akan tercatat coklat pada sitoplasma pada pembesaran 400X (tanda panah hitam). a. Sel odontoblas setelah dilakukan preparasi kavitas, b. Sel odontoblas setelah aplikasi HEMA murni, c. Sel odontoblas setelah aplikasi dentin bonding HEMA

Berdasarkan hasil statistik uji *Tukey HSD*, nilai p untuk kelompok data P1 dan P2 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Nilai p kelompok data P1 dan P3 adalah  $0,002 < 0,05$  maka ada perbedaan

bermakna antar kelompok tersebut. Nilai p kelompok data P2 dan P3 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Jumlah ekspresi MMP-1, kelompok data P3 lebih kecil dibandingkan kelompok P2.

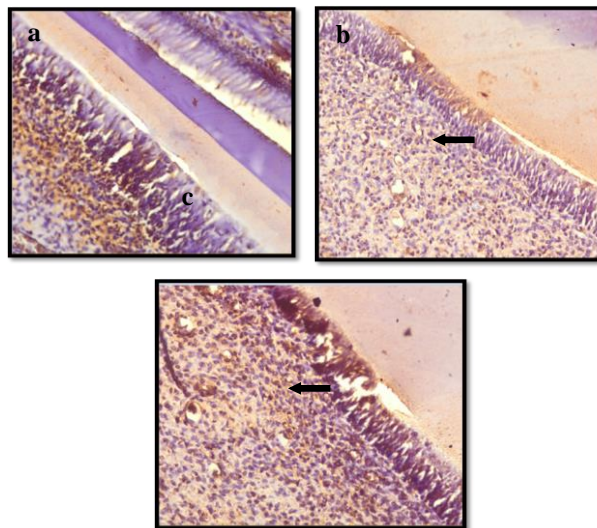
**Tabel 1. Analisis Signifikan Tukey HSD Ekspresi MMP-1**

P	P1 (Kontrol)	P2 (Hema Murni)	P3 (Dentin Bonding HEMA)
P1 (Kontrol)		0,000*	0,002*
P2 (Hema Murni)			0,000*
P3 (Dentin Bonding HEMA)			

Keterangan : \* signifikan  $p < 0,05$

Hasil pemeriksaan histologi dengan pengecatan imunohistokimia pada kompleks dentin-pulpa setelah dilakukan preparasi kavitas, aplikasi HEMA murni

dan dentin bonding HEMA menunjukkan ekspresi TGF-  $\beta$ 1 paling banyak ditemukan pada kelompok A (Kontrol).



Gambar 6. Ekspresi TGF- $\beta$ 1 sel-sel odontoblas pada pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi TGF- $\beta$ 1 akan tercatat coklat pada sitoplasma pada pembesaran 400X ( tanda panah hitam). a. Sel odontoblas setelah dilakukan preparasi kavitas, b. Sel odontoblas setelah aplikasi HEMA murni, c. Sel odontoblas setelah aplikasi dentin bonding HEMA

Berdasarkan hasil statistik uji *Tukey HSD*, nilai p untuk kelompok data P1 dan P2 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Nilai p kelompok data P1 dan P3 adalah  $0,540 > 0,05$  maka tidak ada

perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Nilai p kelompok data P2 dan P3 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Jumlah ekspresi TGF- $\beta$ 1, kelompok data P3 lebih besar dibandingkan kelompok P2.

**Tabel 2. Analisis Signifikan Tukey HSD Ekspresi TGF- $\beta$ 1**

P	P1 (Kontrol)	P2 (Hema Murni)	P3 (Dentin Bonding HEMA)
P1 (Kontrol)		0,000*	0,540
P2 (Hema Murni)			0,000*
P3 (Dentin Bonding HEMA)			

Keterangan : \* signifikan  $p < 0,05$

Hasil uji *Tukey HSD*, nilai  $p$  untuk kelompok data P1 dan P2 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Nilai  $p$  kelompok data P1 dan P3 adalah  $0,540 > 0,05$  maka tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Nilai  $p$  kelompok data P2 dan P3 adalah  $0,000 < 0,05$  maka ada perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Jumlah ekspresi TGF- $\beta$ 1, kelompok data P3 lebih besar dibandingkan kelompok P2.

#### PEMBAHASAN

Sel odontoblas sebagai lapisan perifer kompleks dentin pulpa menjadi sel yang pertama kali merespon adanya rangsangan eksternal. Adanya perbedaan ekspresi MMP-1 diantara ketiga kelompok menunjukkan bahwa semua perlakuan dan pemberian bahan pada dentin dapat menyebabkan iritasi pada sel odontoblas yang akan memberikan respon inflamasi dengan melepaskan sitokin pro inflamasi. Dalam penelitian ini ekspresi MMP-1 yang paling besar dari kelompok HEMA murni dibandingkan dengan Dentin Bonding HEMA.

Ekspresi MMP-1 paling banyak disebabkan oleh trauma mekanik dan aplikasi HEMA murni yang mempunyai konsentrasi tinggi dan jumlah monomer yang lebih besar sehingga menyebabkan kerusakan sel odontoblas lebih besar. Besar konsentrasi mempengaruhi kematian sel pada kultur fibroblas.<sup>7</sup> Pada aplikasi dentin bonding HEMA jumlah monomernya lebih sedikit karena adanya

proses polimerisasi. Sistem bonding yang digunakan *self etch* sehingga memodifikasi smear layer menjadi smear plug yang dapat menutupi tubuli dentin, sehingga menurunkan permeabilitas dentin sekitar 86%. Permeabilitas dentin yang rendah dapat mengurangi efek kerusakan sel dari bahan adesif.<sup>8</sup> Penelitian Gerzina dan Hume menyatakan setiap difusi monomer hema yang melalui dentin sebesar 0,5 mm dapat mengurangi konsentrasi HEMA, sehingga dosisnya dalam dentin bonding tidak memberikan pengaruh yang merugikan. Konsentrasi HEMA dalam dentin bonding ini sekitar 50 – 150  $\mu\text{g/ml}$ . Menurut saraswati konsentrasi HEMA sekitar 5 - 180  $\mu\text{g/ml}$  tidak bersifat toksik pada kultur sel odontoblas.<sup>7</sup> Dentin bonding yang berbasis HEMA tidak bersifat toksik jika dilakukan polimerisasi yang adekuat dan tidak berkontak langsung dengan jaringan pulpa.<sup>9</sup>

Setelah terjadi kerusakan, sel akan merespon untuk melakukan aktivitas penyembuhan dengan melepaskan sitokin anti inflamasi diantaranya adalah TGF- $\beta$ 1. Dalam penelitian ini, kelompok HEMA murni mempunyai jumlah ekspresi TGF- $\beta$ 1 paling kecil, sebab HEMA sangat mengiritasi sel odontoblas dengan konsentrasi tinggi dan jumlah monomer yang banyak. Respon reparatif sel odontoblas menurun sehingga ekspresi TGF- $\beta$ 1 sedikit sedangkan ekspresi pada kelompok kontrol dan kelompok dentin bonding HEMA tidak ada perbedaan yang

bermakna. Disebabkan pengamatan sampel dilakukan pada hari ke tiga, tahap awal replikasi dan sintesis dalam proses homeostatis dan inflamasi sedangkan *peak day* untuk ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada hari tujuh proses inflamasi (Zhang *et al.*, 2014)<sup>10</sup>

Untuk dentin bonding, Hal ini disebabkan oleh berkurangnya jumlah monomer dentin bonding setelah polimerisasi sehingga jumlah iritan berkurang. Pada aplikasi dentin bonding, akan terbentuk monomer sisa setelah dilakukan penyinaran. Menurut Rendjova, setelah polimerisasi akan membentuk monomer sisa sekitar 25 %. Namun, reaksi biologis terhadap bahan bonding dapat dimodifikasi oleh struktur dentin. Dentin berperan sebagai barier difusi dan absorpsi sehingga dapat mengurangi konsentrasi bahan yang diresorpsi. Lapisan dentin yang

tersisa dapat menyerap monomer sisa dan menurunkan konsentrasi monomer sehingga mengurangi efek kerusakan. Penelitian Cobanoglu *et al.*, ketebalan *remain dentin thickness* (RDT) berperan dalam penurunan toksisitas monomer sisa. RDT sebesar 0,5 mm dapat mengurangi efek toksik sebesar 75% sedangkan RDT sebesar 1 mm dapat mengurangi efek toksik sebesar 90%.<sup>8</sup> Semakin besar nilai RDT, semakin banyak TGF- $\beta$ 1 yang mensinyal matriks dentin mensekresi kolagen untuk pembentukan dentin tersier.

Respon sel dapat melakukan proses penyembuhan pada tindakan preparasi kavitas dan aplikasi bahan bonding karena adanya RDT. Kompleks dentin-pulpa dapat kembali normal setelah trauma, selama ketebalan dentin yang melindungi vitalitas pulpa minimal sekitar 2 mm.<sup>11</sup>

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Strassler, Howard E., Mann, Michael. 2014. Dental Adhesive for Direct Placement Composite Restorations: An Update. The Academy of Dental Therapeutics and Stomatology.1-3
2. Bouillaguet, Serge., Wataha, Jhon C., Hanks, Carl T. 1996. In vitro Cytotoxicity and Dentin Permeability of HEMA. J of Endodontics. 22(5):244-9.
3. Moyses, Marcos Ribeiro., Lopes, William Luis., Pereira, Alessandro. 2006. *Biocompatibility of the Prime and Bond 2.1, Prime and Bond NT and ScotchBond MP Primer Adhesive System*. Braz J Oral Sci, 5(18). 1079-84
4. Oliveira, Maria Antonieta., Quagliatto, Paulo Sergio. 2012. Effect of Bleaching Agent and Adhesive System in Dental Pulp. Braz. J. Oral Sci. 11(4):428-32
5. Habn, Chin lo., Lieweber, Frederick R. 2007. Innate Immune Responses of The Dental Pulp to Caries. J Endod. 33: 643-51
6. Hargreaves, Kenneth M., Goodis, Harold E. dan Tay, Franklin.R., 2012. Seltzer and Bender's Dental Pulp.2<sup>nd</sup> ed.Quintessence Publishing.Chicago. pp:301-13
7. Saraswati, Widya. 2010. Optimum dose of 2- hydroxyethyl methacrilate based bonding material on pulp cells toxicity. Dental Journal. 43(2):62-6
8. Cobanoglu, Nevin., Ozer, Fusun., Demirci, Mustafa., Azdemir, Ozgur., Imazato, Satoshi. 2015. Histopathological Evaluation of Human Pulp Response to Two Self-Etching Resins. Journal of Restorative Dentistry. 3(1):1-7
9. Chang, HH., Guo, MK., Kasten, FH., Chang, MC., Huang, GF., Wang, RS. 2005. Stimulation of Glutathione Depletion, ROS Production and Cell Cycle arrest of dental Pulp Cells and Gingival Ephithelial Cells by HEMA. Biomaterial Journal. 26(7):745-53
10. Gupta, Sunil Kumar., Gupta, Java., Saraswhati, Vidya., 2012. *Comparative Evaluation of Microleakage in Class V Cavities Using*

*Various GIC.* Journal Of Interdisciplinary Dentistry. 2(3).164-9  
11. Cupertion, Rogerio Rodrigues., Fabri, Franciele Viana., Veltrini, Vanesa Cristina., Hidalgo, Mirian., Bruschi, Marcos Luciano., De Oliveira, Monteiro Weffort. Histological

Evaluation of The Rat Dental Pulp After Indirect Capping with Sildenafil or L-NAME Incorporated into A Bioadhesive Thermoresponsive System. Acta Scientiarum Health Science. 38(1):95-101