

## Uji sitotoksitas mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wetspinning* pada kultur sel primer L-929 sebagai aplikasi penguat jembatan gigi direk

Nina Djustiana<sup>1\*</sup>, Yanwar Faza<sup>1</sup>, Mutia Hardhiyuna<sup>2</sup>, Andri Hardiansyah<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Teknologi dan Material Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Riset Teknologi Farmasi dan Kedokteran, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

<sup>3</sup>Pusat Riset Fisika, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

\*Korespondensi: e-mail: [nina.djustiana@fkgumpad.ac.id](mailto:nina.djustiana@fkgumpad.ac.id)

Submisi: 01 Oktober 2021; Penerimaan: 31 Oktober 2021; Publikasi online: 31 Oktober 2021

DOI: [10.24198/jidrs.v4i1.36304](https://doi.org/10.24198/jidrs.v4i1.36304)

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Jembatan gigi direk terdiri dari komponen penguat fiber dan komponen matriks resin komposit. Penggunaan sel target untuk uji sitotoksitas dari material fiber kedokteran gigi umum dilakukan secara ekperimental uji in vitro untuk mengetahui relevansi klinis dari pengujian. Penelitian ini bertujuan untuk melihat sitotoksitas dari mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wetspinning* dengan parameter yang berbeda terhadap kultur sel primer (*cell line*) fibroblas L-929. **Metode:** Desain penelitian berupa deksriptif kualitatif. Sel primer fibroblas L-929 diberi paparan mikrofiber PMMA dan PMMA-silika selama 1, 4 dan 7 hari. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan uji MTT Assay. Parameter dari mikrofiber PMMA dan PMMA-silika yang digunakan adalah konsentrasi dan laju alir, kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok penelitian serta diberi nama sebagai berikut: PMMA mikrofiber sistem vertikal 250ml/jam dengan konsentrasi dalam % 0,75(A); 1(B); 1,25(C); PMMA-silika mikrofiber sistem vertikal dengan kecepatan 200 ml/jam (D), 250 ml/jam (E), 300 ml/jam (F) dan PMMA mikrofiber dengan sistem rotasi 200 ml/jam dengan konsentrasi dalam % 0,75(G);1(H), 1,25(I); PMMA-silika mikrofiber sistem rotasi dengan konsentrasi 200ml/jam(J), 250ml/jam (K), dan 300 ml/jam (L). **Hasil:** Uji in vitro dari gambaran sel L-929 memperlihatkan tidak terdapat Sel primer fibroblas yang mengalami kematian. Kurva pertumbuhan *cell line* dari setiap parameter mikrofiber memperlihatkan sel dapat berproliferasi selama masa inkubasi dan memperlihatkan kecenderungan positif dari pertumbuhan sel. **Simpulan:** Mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wetspinning* tidak memperlihatkan sifat toksitas terhadap pertumbuhan *cell line* fibroblas L-929 sehingga mempunyai potensi sebagai aplikasi penguat jembatan gigi direk.

**Kata kunci:** sitotoksitas; sel primer fibroblas; fiber; PMMA; PMMA-silika

## *Cytotoxicity test of PMMA and PMMA-silica wet spinning microfibers in L-929 primary cell culture as a direct dental bridge reinforcement application*

### ABSTRACT

**Introduction:** Direct dental bridge consists of a fiber reinforcement component and a composite resin matrix component. The use of target cells for the cytotoxicity test of dental fiber materials is generally performed by experimental in-vitro tests to determine the clinical relevance of the test. This study was aimed to examine the cytotoxicity of PMMA and PMMA-silica wet spinning microfibers with different parameters on the primary cell culture (*cell line*) of L-929 fibroblasts. **Methods:** The research design was descriptive qualitative. Primary L-929 fibroblast cells were consecutively exposed to PMMA and PMMA-silica microfibers for 1, 4, and 7 days. Cytotoxicity test was performed using the MTT Assay. Parameters of PMMA and PMMA-silica microfibers used were concentration and flow rate, then divided into several research groups and named as follows: PMMA microfiber vertical system 250ml/hour with a concentration in %: 0.75(A); 1(B); 1.25(C); PMMA-silica microfiber vertical system with the speed of 200 ml/hour (D), 250 ml/hour (E), 300 ml/hour (F) and PMMA microfiber with rotation system 200 ml/hour with a concentration in % 0.75(G);1(H), 1,25(I); PMMA-silica microfiber rotation system with concentrations of 200ml/hour (J), 250ml/hour (K), and 300 ml/hour (L). **Results:** In-vitro test of the L-929 cell picture showed no primary fibroblast cells that died. The cell line growth curve of each microfiber parameter shows that the cells can proliferate during the incubation period and show a positive trend of cell growth. **Conclusions:** PMMA and MMA-silica wet spinning microfibers did not show any toxicity to the growth of the L-929 fibroblast cell line, so they have potential as reinforcement applications for direct dental bridges.

**Keywords:** cytotoxicity; fibroblast primary cells; fiber; PMMA; PMMA-silica

## PENDAHULUAN

Kehilangan gigi depan dapat diakibatkan oleh beberapa penyebab diantaranya trauma, penyakit periodontal atau karies gigi yang tidak dapat dilakukan endodontik sehingga menimbulkan permasalahan estetika bagi pasien. Jembatan gigi direk merupakan protesa gigi tiruan yang dapat menggantikan kehilangan gigi dengan bahan fiber dan resin komposit.<sup>1,2,3</sup> PMMA fiber dengan ukuran nano dan mikro banyak diteliti sebagai bahan penguat resin komposit.<sup>4,5</sup> Penelitian Nina Dkk menunjukkan fiber PMMA-silika dapat digunakan sebagai bahan penguat resin BISGMA/TEGDMA.<sup>5</sup> Penelitian lainnya juga memperlihatkan komposit yang diperkuat fiber berbasis PMMA meningkatkan kekuatan fleksural resin komposit sebesar 48.17%.<sup>6</sup>

PMMA merupakan material hidrofobik yang umum digunakan dibidang kedokteran gigi. Penelitian terhadap fiber PMMA banyak dilakukan dan memperlihatkan potensi sebagai bahan perancah atau biomaterial.<sup>4,7,8</sup> Mikrofiber PMMA diketahui dapat disintesis dengan metode *wet spinning*. Penelitian karakteristik dan sifat mekanis dari mikrofiber berbasis PMMA telah dilakukan, namun penelitian terhadap sifat biologisnya belum dilakukan.<sup>9</sup> Beberapa pengujian klinis pada material fiber belakangan mulai menjadi perhatian. Sel primer fibroblas L-929 merupakan sel yang umum digunakan dalam melakukan uji sifat sitotoksitas dari material kedokteran gigi karena laju perumbuhan dan respon biologisnya.<sup>10</sup> Penelitian sitotoksitas banyak dilakukan pada *nanofiber elektrospinning*. Penelitian menyebutkan fiber tidak memperlihatkan toksisitas terhadap jaringan, tidak terdapat respon inflamasi atau kehilangan integritas sel dan tidak terdapat kerusakan sel.<sup>11,12</sup> Pengujian terhadap mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wet spinning* belum banyak diteliti, oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat sitotoksitas dari mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wet spinning* dengan parameter yang berbeda, yaitu konsentrasi dan laju alir, terhadap *cell line* fibroblas L-929.

## METODE

Penelitian ini menggunakan desain penelitian deskriptif kualitatif. Parameter pada uji toksisitas mikrofiber PMMA dan PMMA-Silika yang diuji sitotoksitas adalah laju alir dan konsentrasi dan

dikelompokkan menjadi 12 kelompok sampel, diberi nama A hingga L, yaitu sebagai berikut PMMA mikrofiber dengan sistem vertikal 250ml/jam dengan konsentrasi 0,75% (A), 1% (B), 1,25% (C), PMMA-silika mikrofiber sistem vertikal dengan kecepatan 200 ml/jam (D), 250 ml/jam, 300 ml/jam (E) dan PMMA mikrofiber dengan sistem rotasi 200 ml/jam dengan konsentrasi 0,75% (G), 1% (H), 1,25% (I), PMMA-silika mikrofiber sistem rotasi dengan konsentrasi 200ml/jam(J), 250ml/jam (K), dan 300 ml/jam (L)

*Minimal essential medium* (MEM $\alpha$ ), *fetal calf serum*, penisilin, streptomisin, trypan blue dibeli dari toko kimia dan obat di kota Bandung. 3 - [4,5 - Dimethylthiazol - 2 - y1] - 2,5 - *diphenyltetrazolium bromide*(MTT) dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) diperoleh oleh Sigma Aldrich® (Singapura). Mikrofiber PMMA dan PMMA-Silika diperoleh dari penelitian Chiesa dkk dan Nina dkk menggunakan metode *wet spinning*.<sup>6,9</sup> Sel dari subkultur 50 dan subkultur 54 digunakan untuk mengetahui sitotoksitas. Sel fibroblas tikus dari sel primer permanen L-929(ATCC CCL 1) secara rutin di kultur di dalam MEM $\alpha$  mengandung 10% *fetal calf serum* , penisilin (100U/ml) dan streptomisin (100 $\mu$ g/ml), pada suhu 37<sup>o</sup> C di dalam atmosfer udara mengandung 5% CO<sub>2</sub>. Sebelum uji sitotoksitas, sel L-929 ditumbuhkan di dalam MEM $\alpha$  mengandung 10% *fetal calf serum* , penisilin (100U/ml) dan streptomisin (100  $\mu$ g/ml) untuk di subkultur satu kali dan disimpan didalam medium sel kultur yang mengandung 10% DMSO.

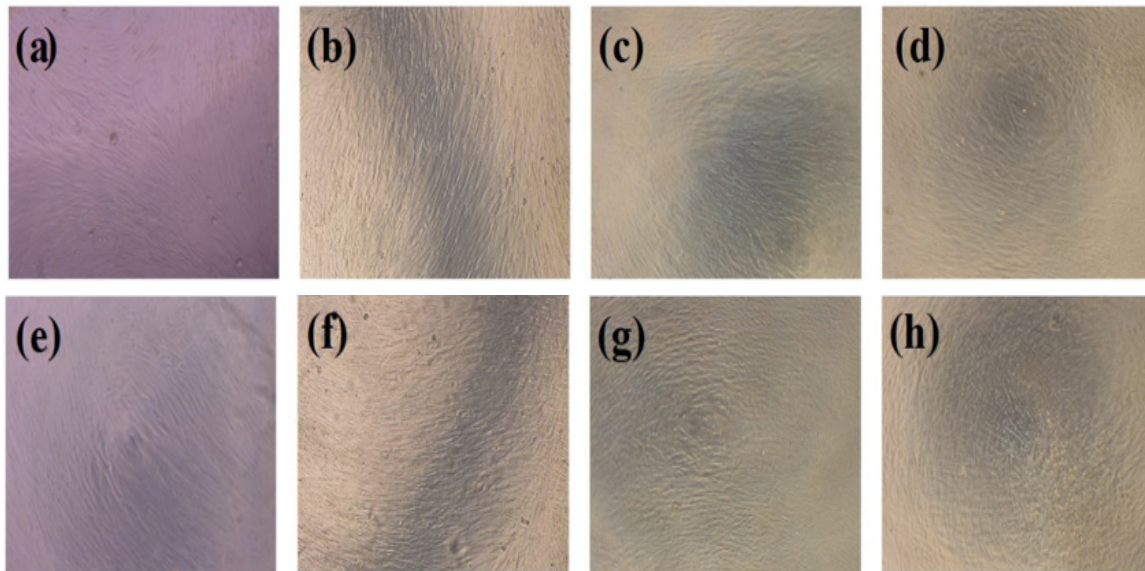
Uji sitotoksitas 1X10<sup>4</sup> sel L-929/well di semai ke dalam plat 96-well dan diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C didalam atmosfer udara mengandung 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. larutan dari 1 mol/l dari setiap spesimen dipersiapkan menggunakan DMSO dan secara bergantian direndam didalam medium sel kultur mengandung konsntrasi DMSO yang mana tidak lebih dari 1%. Sebanyak 12 sel kultur dipaparkan 200  $\mu$ l dari setiap larutan spesimen didalam medium sel kultur pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 1, 4 dan 7 hari. Paparan terhadap sel dihentikan dengan menghilangkan medium spesimen dan viabilitas sel segera dicatat menggunakan *MTT Assay*. Larutan *MTT Assay* (1mg/ml) ditambahkan disetiap well. Setelah 3 jam inkubasi supernatan dikeluarkan dan MTT formazan di larutkan didalam 200  $\mu$ l DMSO selama 1 jam pada suhu ruang. Densitas optis diukur menggunakan spektrofotometer pada

panjang gelombang 540 nm. Gambaran viabilitas sel juga diamati menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 1000X. *Cell line* kontrol dan yang telah diberi perlakuan di tambahkan *trypan blue* untuk mengetahui keberadaan sel yang mati

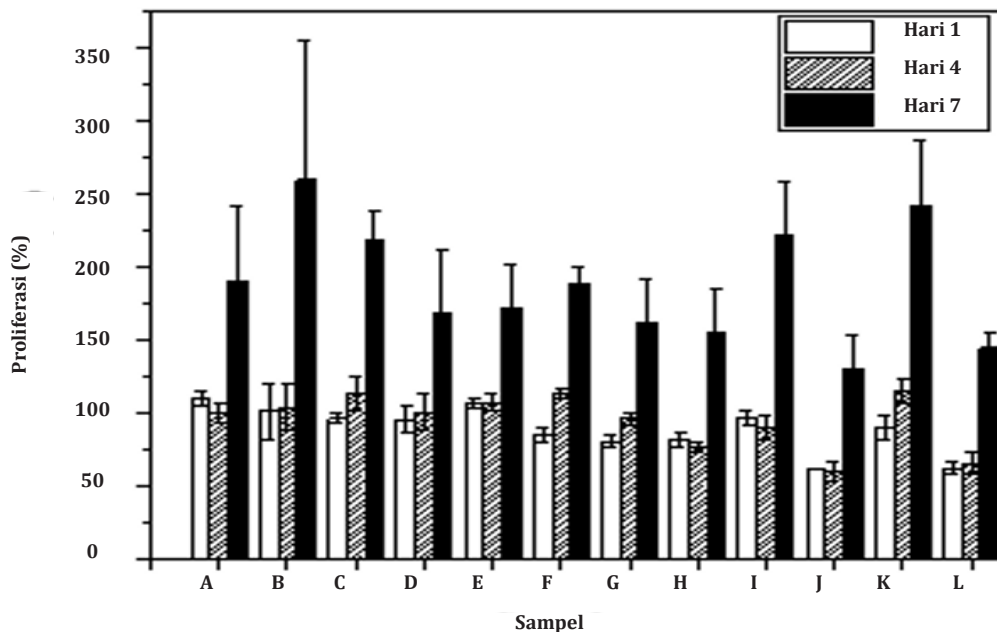
**HASIL**

Uji sitotoksitas melalui hasil pengamatan mikroskop optik pada (Gambar 1) memperlihatkan

gambar mikroskop sel L-929 tidak terdapatnya sel yang terwarnai oleh *trypan blue* sebagai indikasi keberadaan sel mati. Hasil uji MTT Assay pada (Gambar 2) memperlihatkan kurva pertumbuhan sel positif, sel-sel dapat berkembang biak selama hari inkubasi dan menunjukkan tren pertumbuhan yang positif. Hasil ini menunjukkan bahwa serat tidak memiliki efek sitotoksitas ke dalam sel, dengan demikian, serat ini sangat berpotensi diterapkan untuk aplikasi bahan gigi.



Gambar 1. Gambar mikroskop sel L-929 setelah inkubasi dengan kontrol (a, b, c, d) dan serat PMMA (e, f, g, h) masing-masing selama 0, 1, 4, dan 7 hari ( Sumber foto: Dokumentasi pribadi)



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan sel positif pada PMMA mikrofiber dengan sistem vertikal 250ml/jam dengan konsentrasi 0,75% (A), 1% (B), 1,25% (C), PMMA-silika mikrofiber sistem vertikal dengan kecepatan 200 ml/jam (D), 250 ml/jam (E), 300 ml/jam (F) dan PMMA mikrofiber dengan sistem rotasi 200 ml/jam dengan konsentrasi 0,75% (G), 1% (H), 1,25% (I), PMMA-silika mirkofiber sistem rotasi dengan konsentrasi 200ml/jam(J), 250ml/jam (K), dan 300 ml/jam (L)

## PEMBAHASAN

Parameter penelitian seperti prosedur penelitian, kondisi paparan, titik akhir biologis, atau cell line dapat mempengaruhi evaluasi dari sifat biokompatibilitas dental material. *Cell line* L-929 digunakan secara rutin pada prosedur pemeriksaan biologis selama bertahun-tahun dan direkomendasikan oleh standar internasional untuk pengujian alat dan bahan kesehatan dibidang kedokteran gigi karena kemudahan dalam mengontrol kondisi kultur sel. Penggunaan sel yang diisolasi dari jaringan target yang mengekspresikan fenotipe yang sama dengan sel primer untuk jangka waktu yang lama di dalam kultur sangat diinginkan agar menutup celah antara hasil yang diperoleh pada penelitian biokompatibilitas *in vitro* dan *in vivo*.<sup>13,14</sup>

Penelitian ini menunjukkan bahwa mikrofiber PMMA dan PMMA-silika dari 2 parameter, yaitu laju alir dan konsentrasi, di uji sitotoksitasnya terhadap *cell line* fibroblas L-929. Gambaran mikroskop dari serat PMMA yang diinkubasi selama 0 hari, 1 hari, 4 hari dan 7 hari (Gambar 1) memperlihatkan tidak terdapat adanya kematian dari sel L-929. Sel-sel mati umumnya sering berkumpul dan menjadi terlepas namun biasanya tidak terang dan refraktif.<sup>14</sup> Gambaran mikroskop optik tidak memperlihatkan gambaran sel yang menyerap warna trypan blue yang menandakan terdapatnya sel mati. Hal ini membuktikan bahwa serat PMMA tidak toksik terhadap *cell line* fibroblas L-929.

Berbagai garis sel tidak hanya berbeda dalam ukuran dan bentuk tetapi juga berbeda dalam perilaku pertumbuhan. Hasil pengujian MTT Assay (Gambar 2) memperlihatkan pertumbuhan yang positif dari *cell line* fibroblas L-929 dalam durasi 1 hari, 4 hari dan 7 hari terhadap parameter konsentrasi dan laju alir dari mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wet spinning*. Secara sekilas, mikrofiber PMMA-silika, sampel D,E,F,J,K,L memperlihatkan pertumbuhan sel yang lebih sedikit dibandingkan mikrofiber PMMA pada sampel A,B,C,G,H dan I. Nilai rerata pertumbuhan *cell line* L-929 tidak dianalisis secara statistik sehingga tidak dapat diketahui signifikansi perbedaan pertumbuhan antara mikrofiber PMMA dan PMMA-silika. Hasil penelitian sitotoksitas pada mikroskop optik dengan trypan blue serupa dengan penelitian Feuser *et al*<sup>15</sup>, yang mana, senyawa PMMA nanopartikel tidak memperlihatkan reaksi sitotoksitas pada *cell line* THP1 dan A549. Meskipun bentuk PMMA

dan jenis cell line yang digunakan dalam pengujian toksisitas berbeda, peneliti berasumsi bahwa hal tersebut masih memiliki korelasi pada penelitian ini. Penelitian uji toksisitas mikrofiber PMMA-silika juga serupa dengan pengujian Balos *et al*<sup>16</sup>, yang mana nano komposit PMMA-silika tidak memperlihatkan reaksi sitotoksitas pada *cell line* fibroblas paru.<sup>16</sup>

Hal ini dapat mengindikasikan bahwa PMMA maupun PMMA-silika dengan bentuk dan pengujian pada *cell line* yang berbeda tidak menunjukkan reaksi toksisitas. Penelitian ini memperlihatkan mikrofiber PMMA dan PMMA-silika aman digunakan sebagai bahan penguat resin komposit. Penelitian yang telah dilakukan terkait kemampuan fiber berbasis PMMA dan PMMA-silika dalam meningkatkan sifat mekanis dan ditambah dengan hasil uji sitotoksitas yang baik menandakan mikrofiber PMMA dan PMMA-silika berpotensi sebagai bahan alternatif dalam pembuatan restorasi jembatan gigi direk.

## SIMPULAN

Mikrofiber PMMA dan PMMA-silika *wet spinning* tidak memperlihatkan sifat toksisitas terhadap pertumbuhan cell line fibroblas L-929 sehingga mempunyai potensi sebagai aplikasi penguat jembatan gigi direk.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Padjadjaran yang telah memberikan dana melalui program Hibah Riset Kompetensi Dosen Unggulan dengan no kontrak 1959/UN6.3.1/PT.00/2021

## DAFTAR PUSTAKA

1. Wijaya D, Indrastuti M, Sugiarno E. Pembuatan Adhesive Bridge dengan Fiber Reinforced Composite untuk Perawatan Kehilangan dan Kegoyahan Gigi Anterior Rahang Bawah. Maj. Kedokt. Gigi Indones., 2014; 21(1): 61. DOI: [10.22146/majkedgiind.8522](https://doi.org/10.22146/majkedgiind.8522)
2. Zhang M, Matinlinna JP. E-Glass Fiber Reinforced Composites in Dental Applications. Silicon. 2012 4, 73-78. DOI: [10.1007/s12633-011-9075-x](https://doi.org/10.1007/s12633-011-9075-x)
3. Gupta A, Yelluri RK, Munshi AK. Fiber-reinforced Composite Resin Bridge: A Treatment Option in Children. Int J Clin Pediatr Dent. 2015; 8(1): 62-5. DOI: [10.5005/jp-journals-10005-1285](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1285).



4. Chang HY, Chang CC, Cheng LP. Preparation of hydrophobic nanofibers by electrospinning of PMMA dissolved in 2-propanol and water. *MATEC Web Conf.* 2019; 264, 03004. DOI: [10.1051/mateconf/201926403004](https://doi.org/10.1051/mateconf/201926403004)
5. Djustiana N, Faza Y, Sudiyasari N, Firdaus AT, Usri K, Cahyanto, A. Performance of Electrospun PMMA-Silica Nanofiber as Reinforced Material in Dental Composite Restoration. *J Int Dent Med Res.* 2020; 13: 975–8.
6. Djustiana N, Faza Y, Karlina E, Hasratiningsih Z, Munir MM, Khairurrijal, K. Flexural strength evaluation of dental post prototype contain ZAS-PMMA composite fiber with electrospinning Methods. *Key Eng. Mater.* 2020; 829, 93–9.
7. Zafar MS. Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): An Update. *Polymers (Basel).* 2020; 12(10): 2299. DOI: [10.3390/polym12102299](https://doi.org/10.3390/polym12102299).
8. Mathew, M., Shenoy, K., and Ravishankar, K. 2014. Flexural Strength of E-glass-reinforced PMMA. *Int J Exp Dent Sci.* 2014; 3: 24–8. DOI: [10.5005/jp-journals-10029-1063](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10029-1063)
9. Chiesa B. Pengaruh Penambahan Fiber PMMA Hasil Swasintesis Metode Wet Spinning Terhadap Kekuatan Fleksural Pasak Gigi dengan Bahan Bis-GMA. [Skripsi]. Bandung: Unpad. 2020; h.1-41
10. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. In vitro and in vivo cytocompatibility of electrospun nanofiber scaffolds for tissue engineering applications. *RSC Adv.* 2014; 4: 31618–42. DOI: [10.1039/C4RA05218H](https://doi.org/10.1039/C4RA05218H)
11. Zhao C, Tan A, Pastorin G, Ho HK. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(5):654-68. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.001).
12. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlacchio A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(1): 338-51. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2011.06.015](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.015).
13. Jiang Y, Zheng Q, Zhou X, Gao Y, Huang, D. A comparative study on root canal repair materials: a cytocompatibility assessment in L929 and MG63 cells. *Sci World J.* 2014; 463826. DOI: [10.1155/2014/463826](https://doi.org/10.1155/2014/463826)
14. Zhao ML, Liu X.Q, Cao Y. Enhancement of interaction of L-929 cells with functionalized graphene via COOH+ ion implantation vs. chemical method. *Sci. Rep.*,2016; 6: 1–8. DOI: [10.1038/srep37112](https://doi.org/10.1038/srep37112)
15. Feuser PE, Gaspar PC, Ricci-Júnior E. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) pmma and evaluation of cytotoxicity for biomedical application. *Macromol Symp.* 2014; 343: 65–9. DOI: [10.1080/10601325.2010.501306](https://doi.org/10.1080/10601325.2010.501306)
16. Balos S, Puskar T, Potran M. Modulus, strength and cytotoxicity of pmma-silica nanocomposites. *Coatings.* 2020; 10: 1–13. DOI: [10.3390/coatings10060583](https://doi.org/10.3390/coatings10060583)