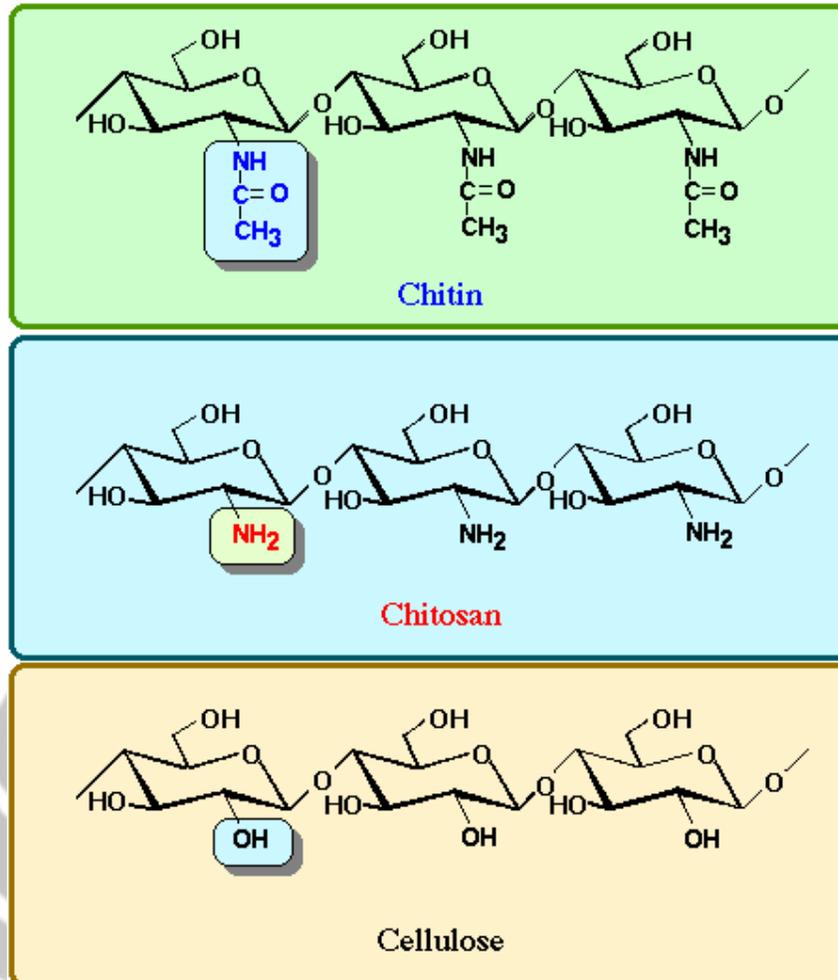


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitosan

Di alam, zat kitin merupakan penyusun kulit hewan-hewan krustasea, seperti udang, kerang, dan juga beberapa eksoskeleton dari serangga dan dinding sel dari beberapa jenis fungi. Kitosan, yang merupakan turunan dari kitin, sangat mudah didapat dari kepiting, udang, lobster, dan kulit udang karang. Menurut Knorr, cangkang atau kulit hewan krustasea mengandung 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat dan kalsium fosfat, dan 20-30% kitin. Dalam pembuatan kitosan yang merupakan turunan dari kitin ini, diperlukan penghilangan protein, kalsium karbonat dan kalsium fosfat yang ada.⁽¹⁴⁾

Kitosan adalah polisakarida yang terdiri dari glukosamin dan unit *N-acetylglucosamine* yang dihubungkan oleh ikatan β (1-4) *glycosidic* dan diproduksi dengan proses deasetilasi dari kitin.⁽⁶⁾ Kemiripan struktur kitosan dengan glukosamin pada matriks ekstra selular menyebabkan efek biokompatibilitasnya terhadap jaringan menjadi lebih baik.⁽⁴⁾ Yang membedakan antara kitin, kitosan, selulosa terletak pada gugus amin (-NH₂) pada kitosan, gugus -NHCOCH₃ pada kitin, dan gugus hidroksil pada selulosa (-OH). Untuk lebih jelas dapat dilihat gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur kimia kitin, kitosan, dan selulosa

Keuntungan kitosan antara lain karena ketersediaannya, biaya yang tidak mahal, biokompabilitas yang tinggi, biodegradabilitas yang baik, dan modifikasi kimia yang cukup mudah. Sifat biokompatibilitas yang dimiliki kitosan disebabkan karena strukturnya yang mirip dengan glukosamin pada matriks ekstra selular.⁽¹⁵⁾ Kitosan memiliki muatan ion positif, dimana kemampuan ini memiliki kemampuan untuk berlekatan dengan muatan negative dari lemak, lipid, kolesterol, ion logam, protein dan *macromolecules*.⁽⁸⁾

2.1.1 Derajat Deasetilasi (DD)

Derajat Deasetilasi (DD) menunjukkan banyaknya gugus amino bebas dalam polisakarida. Secara langsung, DD akan mempengaruhi sifat fisik-kimia dari produk kitosan dan juga mempengaruhi biodegradability serta aktifitas imunologinya.⁽¹⁶⁾ DD kitosan berkisar antara 56% hingga 99% dengan rata-ratanya sekitar 80%, tergantung dari jenis krustasea dan metode pembuatannya. Biasanya, kitin dengan DD 75% atau lebih dapat dianggap sebagai kitosan.⁽¹⁴⁾

2.1.2 Kelarutan Kitosan

Kitosan dapat larut dalam mineral yang telah dicairkan (*dilute mineral*) atau asam organik yang mengandung grup amino bebas dengan pH di bawah 6.0. Asam organik ini dapat berupa asam asetat atau asam format yang telah banyak digunakan secara luas untuk penelitian dan aplikasi kitosan. Tampak bahwa menurut penelitian, asam asetat dapat melarutkan kitosan hingga pada konsentrasi 10%. Beberapa penelitian menunjukkan bila pH diatas 7.0, kitosan tidak mempunyai kelarutan yang baik.⁽¹⁴⁾

Tabel 2.1. Beberapa jenis asam dan konsentrasinya yang dapat melarutkan kitosan.⁽¹⁷⁾

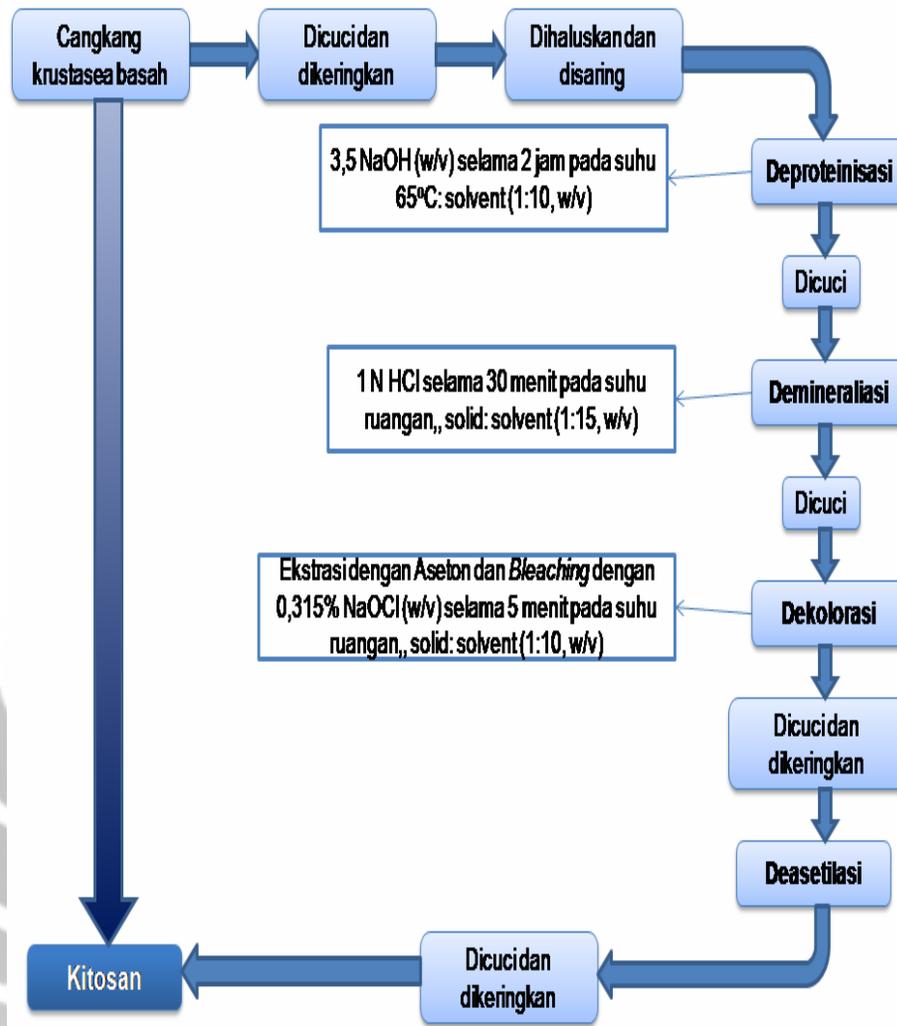
Jenis Asam	Konsentrasi Kitosan yang digunakan				
	1%	5%	10%	50%	>50%
Acetic	+	+	+		
Adipic	+				
Citric	-	+	+		
Formic	+	+	+	+	+
Lactic	+	+	+		
Malic	+	+	+		
Malonic	+	+	+		
Oxalic	+		+		
Propionic	+	+	+	+	
Succinic	+	+	+		
Tartaric	-		+		

2.1.3 Berat Molekul

Kitosan adalah biopolimer dengan berat molekul tinggi. Berat molekul kitosan komersial biasanya berada diantara 100.000 – 1.200.000 Dalton, bergantung dari proses dan kualitas produksi.⁽¹⁸⁾

2.1.4 Pembuatan Kitosan

Kitosan diekstrak dari limbah kulit krustasea misalnya kepiting, udang, lobster, dan udang karang. Kulit ini terdiri dari 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat, dan 20-30% kitin pada basis kering.⁽¹⁴⁾



Gambar 2.2 Bagan proses pembuatan kitosan.

Demineralisasi kitosan meliputi beberapa tahap (**gambar 3**): Demineralisasi (DM), Deproteinisasi (DP), Dekolorisasi (DC), serta Deasetilasi (DA). Tetapi pemisahan kitin hanya memerlukan 2 tahapan: demineralisasi (DM) dan deproteinisasi (DP), yang melibatkan pemisahan kalsium karbonat. Tahapan demineralisasi dan deproteinisasi ini dapat dibalik urutannya.⁽¹⁴⁾

Kitin yang telah melewati tahap demineralisasi dan deproteinisasi memiliki warna pink muda karena adanya pigmen *astaxanthin*. Pigmen ini dieliminasi pada tahap dekolorasi (DC) menggunakan produk *bleaching*. Hasilnya adalah kitin yang tidak

larut di dalam pelarut organik. Walaupun demikian, deasetilasi dari derivat kitosan ini larut dalam asam lemah.⁽¹⁴⁾

Perubahan kitin menjadi kitosan merupakan tahap Deasetilasi (DA). Proses deasetilasi melibatkan pembuangan gugus asetil dari rantai molekul meninggalkan gugus campuran (kitosan) dengan berbagai tingkatan gugus amino dengan reaksi kimia (-NH₂). Dalam tahap ini kitosan didapat dengan menggunakan larutan sodium hidroksida (40-50%) pada 100°C atau lebih untuk 30 menit hingga gugus asetil hilang sebagian atau seluruhnya dari polimer.⁽¹⁹⁾

2.2 Galur Sel (*Cell Line*)

2.2.1 HSC-4

Kanker dapat berasal dari proliferasi yang abnormal dari berbagai macam sel di dalam tubuh.⁽²⁰⁾ Tumor secara umum dapat dibagi menjadi 2 jenis, *benign* dan *malignant*. *Benign* tumor akan terus mengalami proliferasi sel yang terus menerus tetapi tidak metastasis ke organ sekelilingnya. *Malignant* tumor, dapat metastasis ke organ sekitarnya baik melalui pembuluh darah, maupun sistem limfatik.⁽²¹⁾

Sel tumor akan terus berproliferasi hingga menunjukkan proliferasi yang tidak terkontrol. Hal ini terjadi karena sel kanker memproduksi faktor pertumbuhannya sendiri untuk menstimulasi proliferasinya. Kemudian produksi faktor pertumbuhan yang abnormal ini memicu pembelahan sel secara terus menerus. Sel tumor, akan terus tumbuh dan bergerak hingga menyentuh sel tetangganya tanpa adanya *contact inhibition*, bermigrasi dalam keadaan yang tidak teratur, tumbuh dalam pola berlapis-lapis.⁽²²⁾

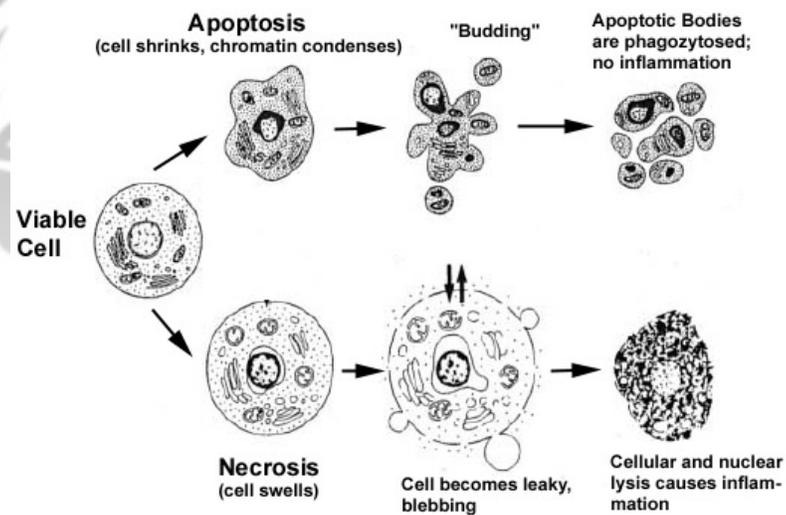
Selain itu, sel kanker dapat menghasilkan factor pertumbuhan untuk membentuk formasi pembuluh darah baru (angiogenesis). Kapiler baru ini penting untuk mensupport nutrisi dan oksigen baru bagi sel dan pembuluh darah baru ini dimanfaatkan untuk metastasis

bagi sel kanker. Sel kanker kehilangan fungsi apoptotik sehingga akan mengalami proliferasi aktif terus menerus. ⁽²²⁾

Menurut Sayuti Hasibuan, kanker rongga mulut memiliki penyebab yang multifaktorial. Secara garis besar, etiologi kanker mulut dibagi atas:

1. Faktor Lokal: kebersihan rongga mulut yang buruk, iritasi kronis restorasi, karies gigi, dan lain-lain.
2. Faktor Luar: karsinogen kimia berupa rokok, termasuk cara penggunaannya, tembakau, radiasi, virus, dan lain-lain.
3. Faktor Host: usia, jenis kelamin, nutrisi imunologik, dan genetik.

Ketiga faktor diatas tidak bekerja secara terpisah melainkan berupa kombinasi dari berbagai faktor. Dan terbentuknya tumor adalah sebagai akibat terjadinya penyimpangan genetik yang disebabkan oleh faktor-faktor etiologi sehingga terjadi pembelahan sel yang berlebihan dan tidak terkendali. Gen yang menjadi sasaran perubahan genetik adalah onkogen (gen yang meningkatkan pertumbuhan), anti-onkogen (gen yang menghambat pertumbuhan), dan gen yang mengatur apoptosis. ⁽²³⁾



Gambar 2.3. Perbedaan antara Apoptosis dan Nekrosis

Proses perubahan genetik sel normal menjadi sel kanker dinamakan onkogenesis. Onkogenesis dapat disebabkan oleh perubahan genetik spontan, paparan terhadap mutagen atau radiation,

gen virus yang diinduksi. Perubahan keganasan sebuah sel terjadi karena adanya perubahan sifat dari proto-onkogen menjadi onkogen dan disertai dengan mutasi *Tumor Suppressor Gene*. Proto-onkogen adalah gen normal yang banyak berperan dalam regulasi proliferasi sel yang dapat berubah menjadi onkogen melalui mutasi.

Karsinoma sel skuamosa dapat tumbuh pada permukaan epitel maupun mukosa yang berupa *stratified squamous epithelium*. Biasanya tumor ini didahului dengan adanya actinic (solar) keratosis, yang merupakan *dysplasia* atau anaplasia dari *epidermal cell*.

HSC-4 merupakan galur sel kanker skuamosa yang dibuat dari kanker skuamosa pada lidah manusia.^(24, 25) Karsinoma sel skuamosa dapat tumbuh pada permukaan epitel maupun mukosa mulut yang berupa *stratified squamous epithelium*. Biasanya tumor ini didahului dengan adanya *actinic* keratosis, yang merupakan *dysplasia* atau anaplasia dari sel *epidermal*. Galur sel ini apabila dikultur di dalam medium DMEM dengan 10% FBS, dengan 5% CO₂, temperatur 37°C akan tumbuh dalam satu lapisan menempel di dasar medium.

2.2.2 HAT-7

Sel ameloblas adalah sel yang membentuk enamel gigi dan umumnya akan hilang ketika gigi akan mulai erupsi. Sel HAT-7 merupakan sel epitel dental yang diturunkan dari *loop* apikal gigi insisif tikus dimana terdapat sel stem niche. Sel HAT-7 mempunyai potensi untuk berdiferensiasi menjadi sel ameloblas akibat kontak antar sel dan overekspresi dari sinyal Notch.⁽²⁶⁾

2.2.3 Apoptosis

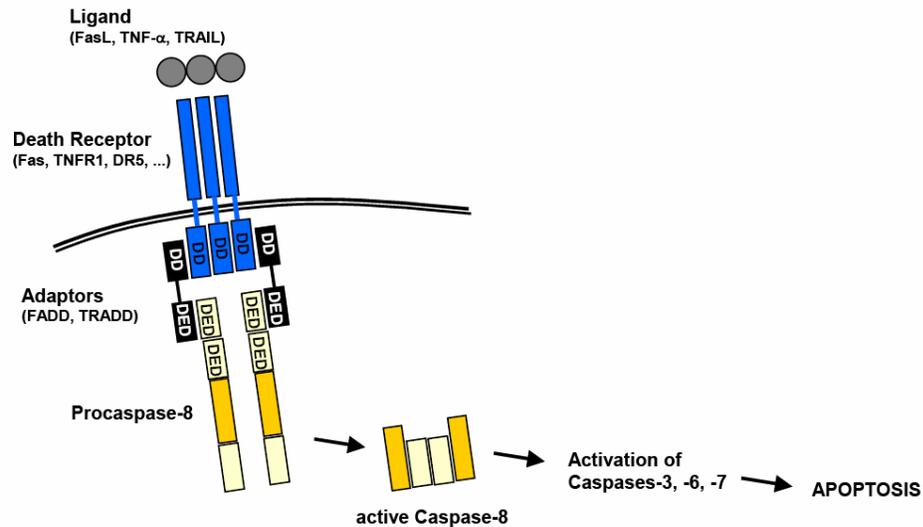
Salah satu keistimewaan sel kanker adalah sel ini tidak memiliki kemampuan untuk apoptosis. Apoptosis adalah kemampuan normal sel untuk mati karena adanya kerusakan DNA maupun karena penyebab dari luar.

Pada sel, *caspases* disatukan sebagai zimogen inaktif, maka mereka disebut *procaspases*, dimana pada N-terminus mereka membawa *prodomain* yang diikuti oleh *subunit* kecil dan besar. Pada saat maturasi, *procaspases* secara proteolitik diproses antara *subunit* kecil dan besar. *Prodomain* terkadang dihilangkan selama proses aktivasi. Sebuah *heterotetramer* yang berisi dua *subunit* kecil dan dua *subunit* besar kemudian membentuk *caspase* aktif.

Proapoptotic caspases dapat dibagi menjadi *initiator caspases* (*procaspases*-2, -8, -9, dan -10) dan *executioner caspases* (*procaspases*-3, -6, dan -7). Ketika *executioner caspases* menguasai hanya *prodomain* pendek, *initiator caspases* menguasai *prodomain* panjang, yang berisi *death effector domains* (DED) pada kasus *procaspase*-8 dan -10 atau *caspase recruitment domains* (CARD) pada kasus *procaspase*-9 dan -2.

Melalui *prodomain* mereka, *initiator caspases* diaktivasi pada signal yang menginduksi kematian baik pada respon terhadap ligasi permukaan reseptor sel mati (*extrinsic apoptosis pathways*) atau sebagai respon terhadap sinyal yang berasal dari dalam sel (*intrinsic apoptosis pathway*).

Pada *extrinsic apoptosis pathways*, *procaspase*-8 ditarik oleh DED-nya kepada *death inducing signalling complex* (DISC), sebuah membran kompleks reseptor yang terbentuk akibat ligasi *tumor necrosis factor receptor* (TNFR). Ketika terikat pada DISC, beberapa molekul *procaspase*-8 berdekatan satu sama lain dan kemudian diasumsikan untuk mengaktivasi satu sama lain dengan *autoproteolysis*.⁽²⁴⁾



Gambar 2.4 Aktivasi caspase

2.3 Kultur Sel

Sel adalah struktur dasar dan unit fungsional terkecil dan kompleks yang menyusun suatu organisme.⁽²⁷⁾ Kultur sel adalah proses dimana sel baik prokariotik atau eukariotik, ditumbuhkan dalam kondisi terkontrol. Kultur sel adalah upaya menumbuhkan sel yang dikondisikan pada suatu lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya.⁽²⁸⁾ Umumnya sel membutuhkan suatu permukaan padat untuk tumbuh dan membelah.⁽²⁷⁾ Sel memerlukan suplai nutrisi dan lingkungan yang steril untuk tumbuh, oleh karena itu sebaiknya lingkungan kultur sebaiknya mempunyai temperatur dan pH yang stabil.⁽²⁹⁾

Kultur sel terbagi menjadi kultur sel primer dan kultur sel sekunder (*cell line*). Sel primer adalah sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organisme melalui pemotongan jaringan normal dan dikultur.^(29, 30) Kultur primer ini hanya dapat dipertahankan dalam periode waktu tertentu. Sedangkan galur sel (*cell line*) adalah keturunan sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatik maupun secara mekanis.⁽³⁰⁾ Empat karakteristik sel yang dapat digunakan untuk mengevaluasi kultur sel adalah morfologi sel, kecepatan

pertumbuhan, efisiensi pertumbuhan, dan fungsi khusus yang dilakukan sel.⁽²⁸⁾ Dalam kultur sel, dapat diamati berbagai perilaku, karakteristik, dan bentuk sel. Oleh karena itu, kultur sel memiliki kegunaan yang bervariasi, antara lain untuk pengamatan biokimia sel, uji toksisitas suatu bahan, penelitian kanker, deteksi dan isolasi suatu virus, serta terapi gen.

Keunggulan kultur sel adalah lingkungannya (pH, suhu, nutrisi pertumbuhan) mudah diatur, dapat menggambarkan karakteristik sel, mudah diukur, dan lebih etis daripada menggunakan hewan percobaan. Namun, kultur sel juga memiliki keterbatasan seperti mudah terkontaminasi, ketidakstabilan genetik dan fenotip, serta biaya pemeliharaannya yang relatif mahal.^(29, 30)

2.3.1 Komposisi Media Kultur Sel

2.3.1.1 D-MEM

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) adalah modifikasi dari Basal Medium Eagle (BME) yang berisi asam amino dan vitamin. D-MEM *high glucose* adalah D-MEM dengan tingkat konsentrasi glukosa 4500 mg/L.⁽³¹⁾ Komposisi lengkapnya adalah 4500 mg/L glukosa, *L-glutamine*, sodium piruvat, dan sodium bikarbonat.

2.3.1.2 Karbohidrat

Karbohidrat merupakan turunan dari gula. Konsentrasi karbohidrat beragam dari 1g/L hingga 4.5g/L.⁽³²⁾ Biasanya, glukosa telah ditambahkan didalam D-MEM.

2.3.1.3 Serum

Serum, campuran kompleks dari albumin, faktor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan, merupakan salah satu konstitusi yang penting dalam media. Kualitas, tipe dan konsentrasi serum mempengaruhi pertumbuhan

sel. Sebelum digunakan, sebaiknya serum dites dalam menghasilkan efisiensi *cloning*, *efisiensi plating* dan kemampuan menjaga karakter sel.

Serum juga membantu melindungi sel terhadap bahaya mekanis saat pencampuran sel atau saat dipanen dengan *cell scraper*. Serum juga mampu berlekatan dan menetralkan racun. Dalam penggunaannya, serum harus diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminasi beberapa jenis virus, khususnya *bovine viral diarrhoea virus (BVDV)* dan mikoplasma.⁽³²⁾ Salah satu contoh serum yang sering digunakan dalam kultur sel adalah *Fetal Bovine Serum (FBS)*. FBS diambil dari serum fetus hewan dan tidak ada tambahan campuran kimia lainnya.⁽⁷⁾ Tambahan 10% FBS menghasilkan tambahan 4.8 mg protein/mL pada cairan kultur.⁽³²⁾

2.3.1.4 Antibiotik dan Antifungi

Biasanya ditambahkan antibiotik dan antifungi kedalam medium kultur. Tujuannya adalah untuk menjaga media kultur sel bebas dari bakteri dan jamur, tanpa membunuh sel kultur didalamnya. Biasanya digunakan antibiotik penisilin dan streptomisin dengan komposisi sodium klorida, *Penicillin G sodium*, dan *Streptomycin Sulfate*.⁽²⁰⁾ Antibiotik ini dapat membunuh bakteri aerob-anaerob, bakteri anaerob dan jamur. *Penicillin G* akan mengganggu tahap akhir dari sintesis dinding sel, sedangkan *Streptomycin Sulfate* akan berlekatan dengan subunit 30S menyebabkan salah pembacaan transkrip genetik. Keduanya merupakan antibiotik spektrum luas (dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif).⁽²⁰⁾

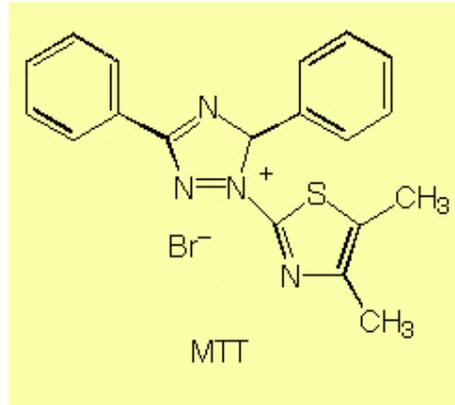
Selain itu, biasanya ditambahkan pula bahan antifungi, misalnya *amphotericine B*. Komposisi dari bahan ini adalah 250 mg/L *amphotericin B* dan 205 mg/L *sodium deoxycholate* dalam air.⁽³³⁾ *Amphotericin B* akan mengubah fungsi dan integritas dari membrane sel eukariotik dengan membentuk kompleks sterol (kolesterol) dan menyebabkan kebocoran glukosa. Maka dari itu, *amphotericin B* tidak berefek pada bakteri.

2.4 Viabilitas Sel sebagai Indikator Sitotoksitas

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel menunjukkan respon sel jangka pendek, seperti perubahan permeabilitas membran atau adanya gangguan pada jalur metabolisme tertentu dalam sel.⁽³⁰⁾ Oleh karena itu, viabilitas sel sering digunakan sebagai penanda sitotoksitas. Tes sitotoksitas ini berfungsi untuk mengetahui efek toksik suatu bahan terhadap sel tertentu.⁽³⁰⁾

Sitotoksitas suatu bahan dapat diukur dengan berbagai macam cara, salah satunya dengan melalui penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas sel.⁽³⁴⁾ Salah satu tes sitotoksitas yang sering digunakan untuk menguji viabilitas sel adalah 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay atau yang lebih dikenal dengan MTT assay.

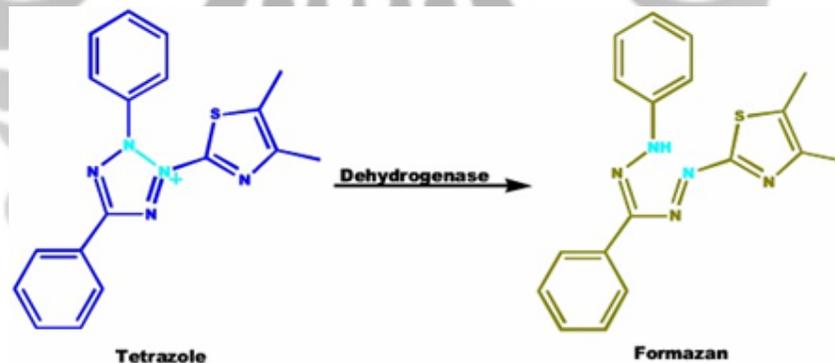
Pertama kali, MTT assay dikenalkan oleh Mosmann pada tahun 1983. Secara fisik, MTT ini merupakan bahan kimia yang berwarna kuning dan dapat larut dalam air. Bubuk MTT ini sensitive terhadap panjang gelombang cahaya tertentu, maka sebaiknya bubuk MTT disimpan dalam tempat yang minim cahaya.⁽³⁵⁾



Gambar 2.5 Struktur MTT.

Prinsip dasar MTT assay adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria sel untuk mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT).⁽³²⁾

Pada proses metabolisme, sel-sel hidup menghasilkan *succinic dehydrogenase mitokondria*. Enzim ini akan bereaksi dengan garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT) dan membentuk kristal formazan ungu yang jumlahnya sebanding dengan aktivitas sel yang hidup, dengan reaksi seperti pada gambar 2.4.⁽³⁶⁾



Gambar 2.6 Reaksi Pembentukan Kristal Formazan

Nilai absorbansi (OD) dari kristal formazan yang telah dilarutkan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (ELISA reader) dengan panjang gelombang antara 550-570 nm.⁽³⁷⁾ Selanjutnya, viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipajan

dengan bahan uji dengan kelompok kontrol (sample tanpa bahan uji) menggunakan rumus dari *In Vitro Technologies* sebagai berikut:

$$\text{Viabilitas Sel (\% dari Kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}}$$

Rumus 2.1 Rumus presentasi viabilitas sel

2.5 Kerangka Teori

