

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

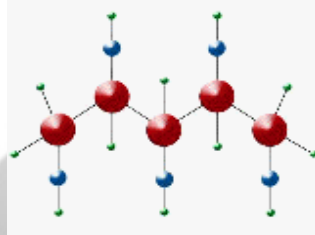
2.1 Xylitol

Xylitol merupakan gula alkohol berantai karbon lima (*polyol*) yang ditemukan pada berbagai macam produk pertanian.¹⁻⁵ Xylitol pertama kali ditemukan oleh seorang peneliti berkebangsaan Jerman bernama Emil Fischer pada tahun 1891.^{1,3,12} Proses pembuatan secara kimianya adalah dengan cara mereduksi *D-xylose* (gula kayu). Bahan yang mengandung *xylan* dihidrolisis untuk menghasilkan campuran monosakarida, termasuk *D-xylose*. Setelah purifikasi, *D-xylose* dikonversi menjadi xylitol. Preparat xylitol pertama berupa sirup campuran yang juga mengandung gula alkohol lainnya.^{1, 11} Xylitol mulai dikembangkan secara biologis setelah perang dunia II, antara lain oleh peneliti asal Jerman, Jepang, dan Uni Soviet.^{1,3} Sebelum tahun 1970, xylitol digunakan di negara-negara tersebut sebagai pemanis bagi penderita diabetes.¹ Xylitol mulai digunakan untuk keperluan kedokteran gigi pada sekitar tahun 1970.¹ Hal ini ditandai dengan mulai diproduksinya permen karet xylitol di Finlandia dan AS pada tahun 1975, dengan tujuan mengurangi karies dan meningkatkan kesehatan mulut.^{1,10}

Xylitol dapat dihasilkan dari *xylan hemicellulose* yang berasal dari berbagai tipe produk selulosa seperti serat kayu pohon *birch*, *raspberry*, dan *strawberry*.¹ Di Finlandia, xylitol diproduksi secara komersil dari kayu pohon *birch*. *Xylan* yang terdapat pada kayu tersebut dihidrolisis dengan asam *xylosa* yang kemudian dipisahkan dengan cara *ion exchange* dan kromatografi. *Xylosa* yang diperoleh kemudian dihidrogenasikan menjadi xylitol dan akhirnya dimurnikan dan dikristalkan.^{1,11}

Sifat kimia dan fisika dari xylitol antara lain adalah berbentuk serbuk, putih, dan tidak berbau. Tingkat kemanisan xylitol adalah 0,8–1,2 kali dari sukrosa (bergantung pada pH larutan), namun xylitol lebih manis dari sorbitol dan manitol. Xylitol sedikit larut dalam alkohol, pH larutan antara 5-7, nilai kalori rendah (1 gram xylitol menghasilkan 2,4 kal), mempunyai efek sensasi dingin yang menyenangkan, dan tahan panas.¹

Karakteristik xylitol dalam kedokteran gigi dipengaruhi oleh struktur kimianya. Xylitol memiliki rantai karbon lima, berbeda dengan sorbitol – juga merupakan *polyol* – yang memiliki rantai karbon enam. Struktur rantai karbon enam pada sorbitol memicu pertumbuhan bakteri kariogenik *S. mutans* dan bakteri mulut lainnya. Organisme kariogenik lebih memilih struktur karbon enam sebagai sumber energi.^{1,3}



Gambar 2.1. Struktur Kimia Xylitol¹⁵

Dari penelitian awal tentang xylitol di Universitas Turku, dilaporkan bahwa insiden DMFT pada kelompok masyarakat yang mengkonsumsi permen karet sorbitol adalah 2,92 berbanding 1,04 pada kelompok yang mengkonsumsi permen karet xylitol. Penelitian pada tahun 1995 menunjukkan bahwa orang yang mengkonsumsi permen karet xylitol lima kali sehari memiliki indeks plak yang jauh lebih rendah.¹⁰

Xylitol berperan secara langsung dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* yang dapat menyebabkan karies gigi.^{1,9} Konsumsi xylitol dalam waktu yang lebih lama akan menyebabkan munculnya mutan yang resisten terhadap xylitol. Mutan-mutan tersebut masuk ke dalam saliva dan menyebabkan reduksi *S. mutans* pada plak serta menghambat transmisi / kolonisasi *S. mutans* dari ibu ke anak. Penggunaan permen karet xylitol oleh ibu (2-3 kali sehari), mulai dari tiga bulan setelah melahirkan hingga anak berusia dua tahun, akan mengurangi tingkat *S. mutans* pada anak. Ini menunjukkan hasil yang lebih baik bila dibandingkan dengan penggunaan *varnish fluoride* atau *varnish chlorexidine*. Pada usia lima tahun, kelompok yang menggunakan xylitol mengalami penurunan tingkat karies hingga 70% bila dibandingkan dengan kelompok yang menggunakan *varnish* atau *chlorexidine*.¹⁰

Namun demikian, ada beberapa efek samping yang dilaporkan bila mengkonsumsi xylitol dalam jumlah yang berlebihan. Mäkinen melaporkan bahwa jumlah asupan xylitol yang memberikan efek positif adalah berkisar antara 4-10 gram per hari.¹ Jumlah yang lebih besar tidak memberikan efek reduksi karies yang lebih besar pula.¹⁰ Diare osmotik dilaporkan terjadi pada pasien yang mengkonsumsi 3-60 gram per hari.¹⁰ Konsumsi xylitol dalam dosis tinggi, yaitu 20% dalam diet makanan / hari atau setara dengan konsumsi ½ kg xylitol pria dewasa, juga dapat memicu terbentuknya batu pada kandung kemih dan menyebabkan tumor.¹⁰

Saat ini xylitol terdapat pada banyak produk kesehatan seperti permen karet, tablet kunyah, pasta gigi, permen pelega tenggorokan, obat kumur, dan obat batuk.¹ Permen karet xylitol telah banyak dikenal sebagai agen preventif yang efektif.¹ Di Jepang, xylitol telah ditetapkan sebagai bahan adiktif makanan yang aman bagi kesehatan tubuh.¹

2.2 Sel-Sel Pulpa Gigi

Pulpa merupakan bagian gigi yang terdiri dari jaringan penghubung vaskular yang terdapat di dalam dinding dentin yang keras. Pulpa memiliki beberapa fungsi utama, yaitu menginduksi perluasan dentin untuk membentuk gigi, melindunginya dari efek rangsang noksius (berbahaya), serta memperbaikinya dengan cara membentuk dentin reparatif atau dentin sekunder. Selain itu, pulpa juga memiliki fungsi menjaga suplai nutrisi ke komponen organik yang dikelilingi oleh jaringan yang termineralisasi.¹³

Pulpa dikenal sebagai organ yang memiliki daya tahan yang sangat kecil dan sedikit kemampuan untuk sembuh kembali. Ketahanannya tergantung pada aktivitas seluler, suplai nutrisi, umur, metabolisme, dll.

Berdasarkan sel-sel yang dikandungnya, pulpa terbagi menjadi empat lapisan, yaitu :

1. Lapisan odontoblast (*odontoblastic layer*); mengandung odontoblast dan terletak dekat predentin.¹³
2. Lapisan bebas sel (*cell free zone*); kaya akan pembuluh darah dan syaraf.¹³

3. Lapisan kaya sel (*cell-rich zone*); mengandung sel-sel fibroblas dan sel-sel mesenkimal yang tidak berkembang.¹³
4. Lapisan pusat (*central zone*) ; berisi pembuluh darah dan saraf.¹³

Peranan pulpa tergantung pada sel-sel yang terdapat di dalam pulpa. Sel-sel yang ditemukan di dalam pulpa meliputi :

1. Sel fibroblas. Sel ini paling dominan di dalam jaringan pulpa gigi. Selnya pipih dan memiliki inti bulat. Dapat berasal dari sel mesenkimal pulpa yang tidak berkembang atau dari bagian fibroblas yang ada. Fibroblast berfungsi mensintesis substansi dasar dan serabut kolagen, yang merupakan matriks pulpa.^{12,13,16}
2. Sel odontoblas. Sel ini berperan dalam dentinogenesis, baik selama pembentukan maupun maturasi gigi. Sel odontoblast dapat menghasilkan komponen matriks organik predentin dan dentin serta berperan dalam degradasi matriks organik dan transpor ion kalsium.¹²
3. Sel-sel imun. Sel-sel imun meliputi sel makrofag, sel limfosit dan sel dendritik.^{12,13} Makrofag berfungsi memfagositosis debris nekrotik dan benda asing. Limfosit berfungsi mengenali antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel dendritik berfungsi menstimulasi limfosit T yang belum pernah terpapar antigen.¹²
4. Sel-sel mesenkim yang belum terdiferensiasi. Gronthos dkk melaporkan adanya populasi sel yang diduga sebagai DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*). DPSCs ini merupakan sel induk pada pulpa yang memiliki potensi proliferasi yang tinggi. DPSCs dapat merespon sinyal spesifik dari lingkungan sekitarnya dan selanjutnya akan menghasilkan sel-sel induk yang baru atau berdiferensiasi menjadi sel lain. Oleh karena itu, DPSCs sangat penting dalam perbaikan dan regenerasi pulpa.¹⁶

Setiap sel dapat mengalami apoptosis dan nekrosis, begitu juga sel pulpa. Nekrosis merupakan proses pasif, hasil kerusakan selular karena kehilangan fungsi protein atau integritas membran plasma. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram, prosesnya aktif, distimulasi dari faktor perkembangan atau lingkungan.¹⁷

Jaringan pulpa normal dan tidak terinflamasi mengandung sel imunokompeten seperti limfosit T, limfosit B, makrofag, dan sel dendritik yang mengekspresikan molekul kelas II yang secara morfologik serupa dengan makrofag dalam jumlah yang banyak. Meningkatnya tingkat beberapa imunoglobulin pada pulpa yang terinflamasi memperlihatkan bahwa faktor-faktor ini berpartisipasi dalam mekanisme pertahanan untuk melindungi jaringan tersebut. Pulpa yang terbuka akan rentan teriritasi. Iritasi pulpa gigi mengakibatkan pengaktifan bermacam-macam sistem biologik seperti reaksi inflamasi nonspesifik yang diperantarai oleh histamin, bradikinin, dan metabolisme asam arakhidonat. Yang juga dilepas adalah produk granula lisosom *polimorphonuclear*.¹⁸

2.3 Kultur Sel

Kultur sel adalah sel yang dikondisikan pada suatu lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya.¹⁹ Dibutuhkan suatu permukaan padat dan nutrisi agar sel dapat tumbuh dengan baik.²⁰ Selain itu, dibutuhkan suatu wadah yang tepat dan medium yang mengandung faktor pertumbuhan tertentu.^{19,20}

Ada sejumlah karakteristik sel yang dapat digunakan untuk mengevaluasi kultur sel, yakni morfologi sel, kecepatan pertumbuhan, efisiensi pertumbuhan, dan fungsi khusus yang dilakukan sel.¹⁹ Berbagai karakteristik itu dapat diamati sehingga kultur sel memiliki bermacam-macam kegunaan, antara lain untuk pengamatan biokimia, uji toksisitas suatu bahan, penelitian kanker, deteksi dan isolasi suatu virus, serta terapi gen.^{19,21}

Sel yang terisolasi dapat tumbuh pada *tissue-culture dish* dengan bantuan suhu yang stabil pada inkubator dan suplemen dari medium yang mengandung nutrisi sel dan faktor pertumbuhan sel. Penggunaan laminar flow dapat menciptakan lingkungan kerja yang meminimalisasi kemungkinan terjadinya kontaminasi.²²

Kultur sel terbagi menjadi dua, yaitu kultur sel primer dan kultur sel sekunder (*cell line*). Sel primer adalah sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organisme, sedangkan *cell line* adalah keturunan sel yang diperoleh dari kultur sel primer yang telah dipisahkan baik secara enzimatis

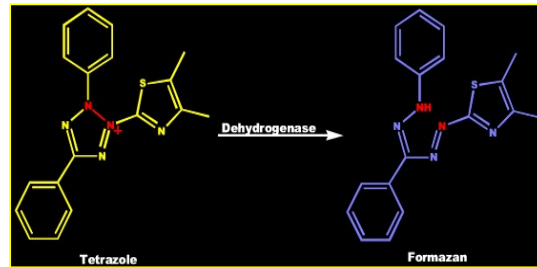
maupun mekanis.²¹ Jika sel-sel primer telah tumbuh dan memenuhi semua substrat kultur, maka mereka harus segera disubkultur untuk memberikan mereka ruang bagi pertumbuhan selanjutnya. *Cell line* yang terdapat pada dasar petri dish dapat dipanen dengan menggunakan *cell scraper*. Jika terdapat kelebihan, sel dapat disimpan dengan menggunakan *cryoprotective agent* (agen anti beku).²¹

Sebagai metode yang digunakan untuk mempelajari suatu sel, kultur sel memiliki beberapa kelebihan, yaitu lingkungan (suhu, pH, nutrisi) yang mudah diatur, mampu menggambarkan karakteristik sel, dan lebih etis (dibandingkan dengan menggunakan hewan percobaan).²¹ Kekurangannya adalah mudah terkontaminasi, ketidakstabilan genetik dan fenotip, dan relatif mahal.²¹ Untuk mengatasi masalah kontaminasi dapat diberikan penambahan bahan kimia yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur seperti antibiotik dan antijamur.²²

2.4 Viabilitas Sel

Viabilitas adalah kemungkinan sel untuk hidup yang ditunjukkan melalui reaksi jangka pendek sel, misal perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu.²³ Dengan demikian, viabilitas sel dapat dijadikan indikator sitotoksitas suatu bahan atau zat.²¹ Salah satu jenis uji sitotoksitas yang digunakan untuk menguji viabilitas sel adalah MTT assay.²⁴⁻²⁶

Pada prinsipnya, MTT mengukur aktivitas seluler berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria sel untuk mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Saat bermetabolisme, sel-sel yang hidup akan menghasilkan *succinic dehydrogenase* mitokondria. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan ungu yang jumlahnya sebanding dengan aktivitas sel yang hidup.²⁴ Kristal tersebut bersifat impermeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air.^{24,25} Perlu suatu zat tambahan sebagai pelarut seperti isopropanol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO) atau larutan deterjen *sodium dodecyl sulfate* (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan ungu.²⁷



Gambar 2.2. Reaksi Perubahan MTT Menjadi Kristal Formazan²⁸

OD (*Optical Density*) yang menunjukkan nilai absorbansi dari suatu kristal formazan yang telah dilarutkan diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 dan 570 nm.^{27,29} Selanjutnya viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipaparkan bahan uji dengan kelompok kontrol (sampel tanpa bahan uji) menggunakan rumus dari *In Vitro Technologies* sebagai berikut.²⁷

$$\text{Viabilitas sel (\% dari kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok perlakuan} \times 100\%}{\text{Nilai absorbansi kelompok kontrol}}$$

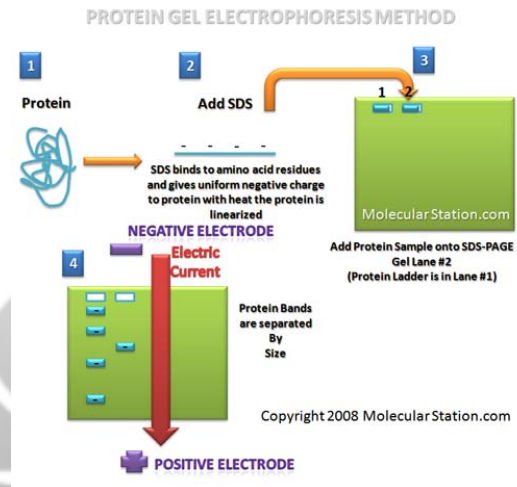
Jika persentasi viabilitas sel lebih kecil dari 100%, maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dikatakan toksik.²⁷

2.5 Profil Protein dan SDS PAGE

Protein adalah senyawa organik kompleks dengan berat molekul tertentu dan merupakan gabungan dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida.^{30,31} Asam amino penyusun protein ada dua puluh jenis.³⁰ Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, sulfur dan fosfor.³¹ Protein yang ditemukan oleh Jons Jacob Berzelius pada tahun 1838 berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus.³¹ Protein merupakan salah satu biomolekul raksasa, selain polisakarida, lipid, dan polinukleotida, yang merupakan penyusun utama makhluk hidup.³¹

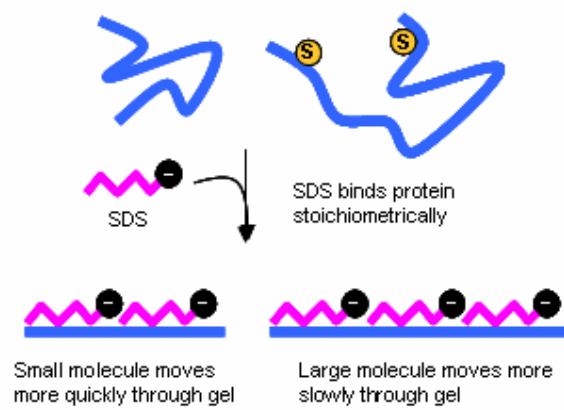
Berat molekul dari rantai polipeptida dapat ditentukan dengan cara membandingkan mobilitas elektroforesis pada SDS *Gel* dengan mobilitas *protein marker* dengan rantai polipeptida dari berat molekul yang diketahui.³³ SDS *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) memiliki kelebihan antara lain

mudah digunakan, cepat memperlihatkan hasil, dan tidak membutuhkan alat-alat yang mahal.³²



Gambar 2.3. Langkah-langkah SDS PAGE³⁴

SDS PAGE secara khusus berguna untuk menganalisis sistem multikomponen seperti enzim kompleks, virus, dan membran-membran tertentu serta mengenali profil suatu protein.³² Profil protein merupakan tampilan *band-band* berbagai protein sel yang merupakan hasil SDS PAGE dan selanjutnya diwarnai dengan *double staining*. *Double staining* merupakan teknik perwarnaan gel dengan menggunakan Coomassie blue, tipe R atau G, dan *silver staining*. *Silver staining* pertama kali diperkenalkan oleh Switzer dkk untuk mendeteksi visualisasi protein.³³ Pada prinsipnya, deteksi protein bergantung pada pengikatan ion perak dengan rantai asam amino, terutama kelompok protein *sulphydril* dan karboksil, yang diikuti oleh reaksi reduksi menjadi metalik perak bebas. *Band* protein divisualisasikan sebagai titik di mana terjadi reaksi reduksi.³³ Gambaran distribusi protein dalam *gel* bergantung pada perbedaan potensial reaksi oksidasi reduksi antara daerah tempat terdapatnya protein dan daerah yang bebas protein.³³ Berat molekul *band-band* protein sel pulpa diketahui berdasarkan berat molekul protein standar seperti *See BluePlus2*.³²



Gambar 2.4 Gambaran SDS Mengikat Protein³⁵

2.6 Kerangka Teori

