

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

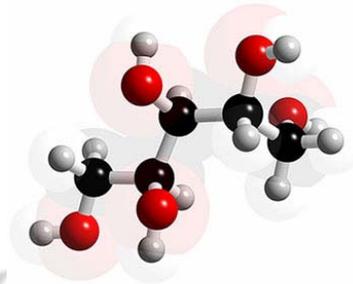
2.1 Xylitol

Xylitol telah diketahui sebagai bahan kimia organik sejak tahun 1890.^(11, 12) Pada tahun 1891, Emil Fischer, kimiawan berkebangsaan Jerman merupakan orang pertama yang berhasil mensintesis xylitol dengan cara hidrogenisasi gula kayu.⁽¹¹⁻¹⁴⁾ Purifikasi xylitol telah berhasil dilakukan pada tahun 1930.⁽¹¹⁻¹³⁾ Setelah Perang Dunia ke-2 usai, pengembangan xylitol dilanjutkan oleh Jepang, Jerman, dan Uni Soviet.⁽¹¹⁻¹³⁾

Xylitol dapat ditemukan secara alami dari berbagai jenis tanaman dan buah yang mengandung *hemicellulose* seperti dari raspberi, strawberi, selada, kembang kol, jamur, kacang, dan batang pohon *birch*.^(1, 2, 4, 12) Xylitol juga merupakan produk *intermediate* yang secara teratur muncul pada proses metabolisme glukosa manusia, bahkan pada metabolisme normal kita dapat memproduksi xylitol sampai 15 gram setiap harinya.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Walau xylitol terdapat di dalam berbagai macam buah dan sayuran, jumlahnya sangat sedikit bila ingin diproduksi secara massal. Produksi xylitol secara komersil pertama kali dilakukan di Finlandia pada abad ke-20.^(3, 12) Bahan baku utama dari xylitol adalah *hemicellulose* dengan nama kimia *xylan*, sebuah molekul polisakarida rantai panjang yang mengandung *D-xylose*. Untuk mendapatkan *D-xylose*, *xylan* dihidrogenasi kemudian hasilnya diseparasi dengan *chromatography* skala besar untuk mendapatkan xylitol.⁽¹²⁾

Secara kimia, xylitol dapat dikatakan sebagai gula alkohol golongan pentitol karena memiliki lima atom karbon dan lima gugus hidroksil (Gambar 2.1).^(3, 12-14) Struktur kimia xylitol berbeda dengan gula lainnya seperti sukrosa ataupun sorbitol yang memiliki enam atom karbon.⁽¹²⁾ Karena hanya memiliki lima atom karbon, xylitol tidak dapat digunakan oleh beberapa jenis bakteri sebagai sumber tenaga.⁽¹²⁾ Penelitian Agustina *et al.* menunjukkan bahwa pasta gigi yang mengandung xylitol dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus*

mutans serotip C.⁽¹⁵⁾ Selain itu, penelitian Su-Ji *et al.* juga menunjukkan bahwa xylitol mampu menekan pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*.⁽⁵⁾



Gambar 2.1. Model Struktur Atom Xylitol ($C_5H_{12}O_5$)⁽³⁾

Xylitol juga dapat dijadikan sebagai pemanis alternatif karena memiliki rasa yang serupa dengan sukrosa, namun memiliki kalori 40% lebih sedikit dan karbohidrat 75% lebih sedikit dari sukrosa.^(12-14, 16) Di antara gula alkohol, xylitol memiliki rasa yang paling manis.⁽¹⁶⁾

Xylitol telah banyak digunakan sebagai zat pengganti gula yang aman dikonsumsi oleh manusia, bahkan oleh penderita diabetes.^(1, 3, 13) Menurut *Joint Expert Committee on Food Additive (JECFA)*, batas *Acceptable Daily Intake (ADI)* dari xylitol adalah tidak terbatas.⁽¹²⁾ Pada tahun 1986, *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)* menyimpulkan bahwa xylitol aman dikonsumsi oleh manusia.^(12, 14) Setelah melakukan evaluasi panjang tentang xylitol, pada tahun 1997 Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Pemerintah Jepang juga menyatakan bahwa xylitol adalah bahan makanan tambahan yang aman dikonsumsi.⁽¹²⁾

Namun, gangguan yang ditimbulkan oleh xylitol seperti diare osmotik dapat terjadi bila mengkonsumsi xylitol dalam jumlah yang berlebihan (0,5 g / Kg BB).^(1, 3, 12-14) Gangguan pencernaan ini terjadi karena xylitol diserap secara lambat di saluran pencernaan sehingga menimbulkan terjadinya retensi air pada saluran cerna. Gangguan tersebut biasanya akan hilang setelah beberapa hari karena enzim yang memecah xylitol (poliol dehidrogenase non-spesifik) mulai

menyesuaikan dengan jumlah xylitol yang ada di dalam tubuh.^(12, 13) Enzim poliol dehidrogenase non-spesifik ini akan meningkatkan kecepatan absorpsi xylitol.⁽¹²⁾

Pemanfaatan xylitol dalam beberapa tahun belakangan ini semakin meluas. Di negara maju, xylitol dapat ditemukan dalam berbagai macam bentuk seperti permen karet, tablet hisap, permen, cokelat, es krim, roti, saus, minuman, obat-obatan, dan produk kesehatan gigi.⁽¹⁴⁾ Di Indonesia, sampai saat ini xylitol baru dapat ditemui dalam bentuk permen, wafer, suplemen obat, permen karet dan pasta gigi.

2.2 Pulpa Gigi

Pulpa gigi merupakan jaringan ikat yang unik karena dikelilingi oleh jaringan keras.^(6, 17) Pulpa gigi berasal dari sel-sel ektomesenkim papila dentis. Dalam pembentukannya, sel-sel ektomesenkim tersebut baru dapat dikatakan sebagai jaringan pulpa gigi setelah dentin terbentuk.⁽¹⁷⁾

Fungsi utama pulpa gigi adalah fungsi formatif, yaitu berperan dalam membentuk odontoblast yang akan membentuk dentin.⁽¹⁷⁾ Fungsi lainnya antara lain adalah (1) Induktif, menginduksi pembentukan email dengan mengembangkan sel odontoblast yang dapat membentuk dentin; (2) Nutritif, menyediakan nutrisi yang diperlukan bagi pembentukan dentin; (3) Defensif, membentuk pertahanan dari invasi bakteri atau benda asing yang masuk melalui tubuli dentin; dan (4) Sensatif, memberikan rasa atau sensasi sebagai respons terhadap berbagai rangsangan.⁽¹⁷⁾

Fungsi dari pulpa gigi tergantung pada jenis sel yang berperan di dalamnya. Sel-sel yang menyusun jaringan pulpa gigi yaitu:

- Odontoblast

Odontoblast merupakan sel yang paling penting dari keseluruhan jaringan pulpa gigi.⁽¹⁷⁾ Odontoblast juga merupakan sel yang paling tinggi tingkat diferensiasinya.⁽⁶⁾ Odontoblast berfungsi untuk menghasilkan komponen organik matriks pre-dentin dan dentin, seperti kolagen (khususnya tipe I) dan proteoglikan.⁽⁶⁾ Odontoblast merupakan sel akhir dan tidak dapat mengalami mitosis lagi.⁽¹⁷⁾

- Fibroblast

Fibroblast merupakan sel yang paling banyak ditemui pada jaringan pulpa gigi.^(6, 17) Fungsi utama dari sel ini adalah mensintesis kolagen tipe I dan III, fungsi lainnya adalah mensintesis dan mensekresi komponen non-kolagen matriks ekstraselular. Aktivitas mitosis fibroblast cukup lambat pada orang dewasa, namun akan bermitosis dengan cepat bila terjadi kerusakan jaringan.⁽⁶⁾

- Sel Mesenkhim yang tidak terdiferensiasi

Sel ini dapat berdiferensiasi menjadi fibroblast ataupun odontoblast tergantung dari rangsangan yang diberikan.^(6, 17) Sel ini merupakan cadangan dari adanya kekurangan sel-sel seperti fibroblast atau odontoblast yang ada.⁽¹⁷⁾ Pada manusia lanjut usia, jumlah sel ini sedikit sehingga kemampuan untuk regenerasi sel pulpa pun berkurang.⁽⁶⁾

- *Immunocompetent*

Sel yang termasuk di kategori ini merupakan sel pertahanan yang didapat dari aliran darah.⁽⁶⁾ Sel ini berfungsi saat adanya invasi bakteri atau benda asing. Pada pulpa gigi, sel-sel imun yang dijumpai adalah limfosit, makrofag, dan dendritik.

Sel-sel *immunocompetent* yang ada pada pulpa gigi dapat merespon berbagai situasi klinis yang dapat menyebabkan kehilangan integritas jaringan keras gigi.⁽⁶⁾ Salah satu responnya adalah peradangan. Peradangan pada pulpa gigi (pulpitis) biasanya terjadi bila ada invasi bakteri ataupun produk-produknya.^(7, 18) Pulpitis juga dapat terjadi karena adanya iritan-iritan kimia, fisik, thermis, dan stimulasi elektrik.⁽⁷⁾ Anatomi pulpa gigi yang dikelilingi oleh jaringan keras mengakibatkan tampilan klinis peradangan yang terjadi pada pulpa gigi berbeda dengan lokasi lainnya.⁽⁷⁾ Gejala klinis peradangan seperti panas, bengkak, dan kemerahan tidak dapat dilihat pada pulpitis, hanya rasa nyeri saja yang merupakan gejala klinis terjadinya pulpitis.⁽⁷⁾

Sel-sel odontoblast ataupun sel yang menyerupai odontoblast (*odontoblast-like cells*) dapat terstimulasi oleh iritan kimia dan membentuk dentin

tersier.⁽¹⁸⁾ Dentin tersier merupakan mekanisme pertahanan pulpa dalam menggantikan struktur jaringan keras gigi yang rusak.⁽¹⁸⁾ Dentin tersier yang dibentuk oleh sel odontoblast yang masih bertahan dinamakan dentin reaktif, sedangkan dentin tersier yang dibentuk oleh *odontoblast-like cell* dinamakan dentin reparatif.⁽¹⁸⁾ Respon pembentuk dentin tersier merupakan metode yang efektif dalam melindungi jaringan pulpa dari berbagai macam iritan khususnya dari invasi bakteri.^(18, 19)

Bila rangsangan yang mempengaruhi sel-sel pulpa terlalu kuat, kematian sel dapat terjadi. Nekrosis merupakan kematian sel yang tidak terkontrol, hal ini biasanya terjadi karena ada faktor eksternal seperti invasi bakteri. Di lain pihak, apoptosis atau kematian sel yang terencana, merupakan kondisi normal pada proses perkembangan organisme multiselular. Kematian sel tersebut terjadi dalam keadaan yang terkontrol, hal inilah yang membedakan antara apoptosis dengan nekrosis.⁽²⁰⁾

2.3 Kultur Sel

Kultur sel telah lama dilakukan sebagai metode untuk mengetahui aktivitas sel tanpa dipengaruhi variasi sistemik yang mungkin ada pada subjek penelitian.⁽¹⁰⁾ Berdasarkan kemampuan sel untuk melekat pada wadah kultur, sistem kultur sel dibagi menjadi dua, yaitu sel dapat melekat pada permukaan wadah kultur (*monolayer culture system*) atau sel mengambang bebas pada medium (*suspension culture system*).⁽⁹⁾

Menurut asalnya, kultur sel dapat dibagi menjadi dua, yaitu kultur primer (*primary culture*) dan sub-kultur (*subculture*). Kultur primer merupakan metode kultur sel dimana sel yang digunakan didapat langsung dari organisme atau jaringan yang bersangkutan. Sedangkan sel yang terdapat pada metode sub-kultur didapat dari sel-sel yang ada pada kultur sel sebelumnya. Metode sub-kultur biasanya dilakukan ketika sel yang dikultur telah tumbuh memenuhi seluruh permukaan wadah kultur. Perkembangan sel akan terhenti apabila tidak tersedia ruang kosong. Dengan melakukan sub-kultur, sel-sel tersebut akan dapat terus berkembang.⁽⁹⁾

Salah satu keuntungan dari penggunaan metode kultur sel adalah dapat mengkondisikan keadaan yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel seperti suhu, pH, tekanan osmotik, dan tekanan O₂ dan CO₂.⁽¹⁰⁾ Walau lingkungan sekitar sel dapat dikontrol, beberapa jenis sel tertentu masih membutuhkan medium khusus untuk hidupnya.⁽¹⁰⁾

Medium kultur merupakan bagian yang penting dalam metode kultur sel.⁽⁹⁾ Selain menyediakan kebutuhan nutrisi bagi sel, medium kultur juga harus memiliki faktor pertumbuhan, dapat mengontrol pH dan osmolalitas, serta menyediakan gas esensial (CO₂ dan O₂).⁽⁹⁾ Nutrisi yang terkandung di dalam medium kultur adalah asam amino, vitamin, mineral, dan karbohidrat.⁽⁹⁾ Nutrisi inilah yang mendukung sel dalam membentuk protein baru dan komponen penting lainnya yang berguna untuk pertumbuhan dan dalam menjalankan fungsinya, seperti menyediakan energi untuk metabolisme.⁽⁹⁾

Medium kultur pertama kali didapat dari cairan tubuh ataupun dari ekstrak jaringan seperti ekstrak embrio ayam, serum, limfe, dsb.⁽¹⁰⁾ Namun selama 30 tahun terakhir ini, perkembangan dan penelitian mengenai medium kultur semakin pesat sehingga berbagai jenis medium kultur kini mudah didapat.⁽²¹⁾

2.4 Protein sebagai Indikator Aktivitas Sel

Protein merupakan komponen sel yang beratnya mencapai lebih dari 50% berat sel dalam keadaan kering.⁽²²⁾ Protein juga menentukan bentuk dan struktur sebuah sel serta berfungsi sebagai alat utama dalam mengenali molekul tertentu dan proses katalis.⁽²²⁾ Fungsi dari protein secara umum dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Fungsi Biologik Protein ⁽²³⁾

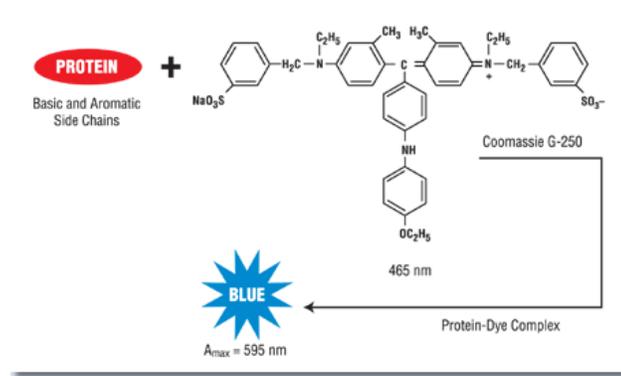
<i>Fungsi</i>	<i>Contoh Protein</i>
Katalisis	Tyrosine Hydroxylase (produksi hormon & neurotransmitter)
Pengikat	Hemoglobin (transportasi oksigen)
Transportasi	Immunoglobins (sistem imunitas tubuh)
Pengikat	Insulin (hormon) & reseptor Insulin
Pertahanan	Collagen (jaringan ikat)
Pengikat : Informasi	

Secara kimia, protein merupakan polimer linier panjang yang tersusun dari banyak asam amino yang bergabung dengan adanya ikatan peptida, oleh sebab itu protein juga dapat disebut dengan polipeptida.^(22, 24) Walau terdapat banyak jenis asam amino, hanya 20 jenis saja yang umum terdapat pada protein.^(22, 23) Jenis asam amino yang membentuk sebuah protein akan menentukan fungsi protein tersebut.^(22, 24)

Protein sangat dibutuhkan oleh sel untuk mempertahankan hidupnya dan untuk berproliferasi.⁽²²⁾ Oleh karena itu kandungan protein atau asam amino harus ada pada medium kultur. Kandungan protein yang terdapat pada medium kultur, dapat menjadi salah satu indikator aktivitas sel dalam kultur.

Bradford *protein assay* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi protein medium kultur dengan cara mendeteksi dan menghitung jumlah total proteinnya. Metode ini pertama kali dijelaskan oleh Dr. Marion Bradford pada tahun 1976 dengan menggunakan Coomassie *Briliant Blue G-250 Dye* (CBBG) sebagai bahan utamanya.⁽²⁵⁾

Reagent Bradford yang bersifat asam akan membuat protein berikatan dengan CBBG. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya perubahan warna dari cokelat kemerahan (absorbansi maksimum 465 nm) menjadi berwarna biru (absorbansi maksimum 610 nm).⁽²⁵⁾ Konsentrasi protein suatu larutan dapat diketahui dengan menggunakan alat spektrofotometer.^(25, 26) Nilai absorbansi optimal untuk mendeteksi konsentrasi protein adalah 595 nm.^(25, 26) Skema reaksi yang terjadi pada Bradford *protein assay* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Skema Reaksi Coomassie (Bradford) *Protein Assay* ⁽²⁵⁾

SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis*) merupakan teknik biologi molekuler yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya.⁽²⁷⁾ SDS itu sendiri merupakan deterjen yang dapat mengubah bentuk protein yang rumit menjadi protein linear sederhana.⁽²⁷⁻²⁹⁾ SDS yang mengandung muatan negatif akan mengubah protein menjadi bermuatan negatif. SDS juga dapat melepaskan ikatan *hydrophobic*, ikatan hidrogen, dan ikatan elektrostatik protein sehingga bentuk protein menjadi linear.⁽²⁷⁻³⁰⁾

Elektroforesis itu sendiri berarti teknik memisahkan atau memecah molekul dengan dipengaruhi arus listrik.⁽²⁷⁾ Kemampuan molekul tersebut terpisah atau kecepatan bergerak suatu molekul ditentukan oleh beda potensial yang ada.⁽²⁷⁾ Namun, karena banyak protein yang memiliki beda potensial yang tidak jauh berbeda walau ukuran dan berat molekulnya berbeda, proses elektroforesis saja tidak dapat memisahkan molekul-molekul protein yang ingin diamati.⁽²⁷⁾ Untuk itu digunakan *polyacrylamide gel* untuk dapat memisahkan molekul berdasarkan ukuran molekul proteinnya.⁽²⁷⁻²⁹⁾

Gel akrilamid merupakan bagian penting yang berfungsi memisahkan meekul protein yang besar dengan yang kecil.⁽²⁷⁻²⁹⁾ *Gel* ini didapat dengan cara polimerasi monomer akrilamid menjadi rantai *polyacrylamide* yang saling berikatan silang sehingga membentuk matriks semi solid.⁽²⁷⁾ Ukuran pori-pori dari *gel* yang tercipta dapat bervariasi tergantung pada pengaturan konsentrasi *polyacrylamide* yang dipakai.⁽²⁷⁾ Besarnya pori-pori tersebut akan menentukan kemampuan *gel* untuk dapat menseparasi protein berdasarkan ukuran

molekulnya.⁽²⁷⁾ Ketika arus listrik dialirkan, molekul protein yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan molekul protein yang lebih besar, hal ini akan memperlihatkan separasi molekul protein berdasarkan ukurannya.⁽²⁷⁾

Terdapat dua jenis *gel* yang digunakan, (1) *stacking gel*, dengan pori-pori relatif besar berguna untuk menyamaratakan posisi seluruh molekul protein baik yang besar ataupun yang kecil sebelum terseparasi; dan (2) *resolving gel*, dengan pori-pori yang lebih kecil berfungsi untuk menahan molekul ukuran besar dan meloloskan molekul ukuran kecil sehingga terjadi separasi molekul berdasarkan ukurannya.⁽²⁸⁾

Molekul protein yang telah di-elektroforesis perlu diberi pewarnaan agar dapat diamati dengan mudah.⁽²⁷⁻²⁹⁾ Beberapa metode yang dapat dipakai pada tahap pewarnaan ini antara lain dengan menggunakan *Coomassie Blue staining*, *Silver staining*, atau *double staining* (*Coomassie Blue* dan *Silver*). *Coomassie Blue* merupakan salah satu bahan yang sering digunakan untuk pewarnaan *gel* dengan sensitivitas pewarnaan yang tinggi.⁽³¹⁾ Karena sifat *Coomassie Blue* yang dapat bereaksi dengan protein, *band-band* protein yang ada di *gel* akan terwarnai tanpa disertai perubahan warna pada matriks *gel*.⁽³¹⁾

Berbeda dengan *Coomassie Blue staining*, *Silver staining* dapat mewarnai protein dengan tingkat sensitivitas yang lebih tinggi.⁽³²⁾ Mekanisme dasar pewarnaan ini adalah adanya reduksi ion perak menjadi logam perak.⁽³³⁾ *Silver nitrate* yang digunakan akan bereaksi dengan protein pada kondisi asam.^(32, 33) Reduksi ion perak menjadi logam perak terjadi karena adanya oksidasi *formaldehyde* pada kondisi basa.^(32, 33) Daerah yang terdapat *band* protein dan memiliki potensial reduksi tinggi akan menghasilkan gambaran positif.⁽³³⁾

Metode *double staining* merupakan gabungan dari metode *Coomassie Blue staining* dan *Silver staining*.⁽³³⁾ Penggunaannya dapat didahului dengan *Coomassie Blue staining* ataupun *Silver staining*.⁽³³⁾ Gambaran yang dihasilkan akan saling melengkapi sehingga *band-band* protein yang terwarnai akan semakin lengkap.⁽³³⁾

Band-band protein yang telah terlihat dapat diidentifikasi berat molekulnya dengan menggunakan *Gel Doc* berdasarkan marker protein yang digunakan.

2.5 Kerangka Teori

