

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi kronis yang disebabkan oleh bakteri dalam rongga mulut. Proses inflamasi yang berlanjut akan merusak gingiva, ligamen periodontal, sementum, serta tulang alveolar. Kerusakan tulang alveolar yang parah mengakibatkan kehilangan pada jaringan pendukung gigi sehingga menyebabkan tanggalnya gigi. Kehilangan gigi dapat menurunkan kualitas hidup akibat dari ketidakstabilan oklusi. Terapi regenerasi jaringan periodontal telah diperkenalkan beberapa tahun terakhir tetapi sampai saat ini, pemulihan sempurna kembali ke keadaan semula belum tercapai (Usui *et al.*, 2021). Perbaikan tulang yang mengalami kerusakan parah merupakan tantangan besar dalam bidang kedokteran gigi sehingga dikembangkan biomaterial dengan menggabungkan konsep biokimia, biofisika, dan ilmu material yang seimbang agar tercipta biomaterial yang biokompatibel (Giacomo *et al.*, 2020).

Sel punca mesenkimal dikenal sebagai sel multipoten dan merupakan sel yang dapat berdiferensiasi menjadi sel spesifik. Sel punca mesenkimal dapat berasal dari jaringan dewasa dengan berbagai sumber berbeda antara lain kulit, jaringan adiposa, darah tepi, sumsum tulang, pankreas, usus, otak, folikel rambut, dan sel pulpa gigi. Jaringan pulpa telah terbukti menjadi sumber sel punca mesenkimal. (Potdar dan Jethmalani, 2015; Ullah *et al.*, 2015). Sel punca mesenkimal pulpa gigi pertama kali diisolasi adalah *human dental pulp stem cells* (hDPSCs) dari gigi molar ketiga impaksi, kemudian *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (SHEDs) diisolasi dari gigi sulung dengan

kemampuannya untuk meregenerasi jaringan (Nakajima *et al.*, 2018; Gan *et al.*, 2020). SHED merupakan sel yang berperan pada terapi regeneratif karena kemampuan berproliferasi tinggi, bersifat multipoten, dan immunosupresif (Luo *et al.*, 2019). SHED dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel, seperti adiposit, endotel, neuron, serta osteogenik (Rosa *et al.*, 2016).

Perkembangan penelitian sel punca telah meluas karena kemampuannya dalam terapi regeneratif (Potdar dan Jethmalani, 2015). Dalam terapi sel punca mesenkimal terdapat masalah seperti dapat menyebabkan perkembangan tumorigenesis, kelangsungan hidup sel yang buruk, serta dapat mentransmisi penyakit menular. Metabolit sel punca menjadi alternatif dalam mengatasi masalah dalam terapi sel punca dengan aktivitas parakrinnya menggantikan sel punca sebagai terapi baru regeneratif (Katagiri *et al.*, 2017; Bar *et al.*, 2021). Sel punca mesenkimal telah dibuktikan mensekresi metabolit yang kaya akan sitokin, faktor pertumbuhan, kemokin, dan nanopartikel ekstraseluler (Luo *et al.*, 2019). Metabolit memiliki berbagai manfaat klinis dan dapat diproduksi dalam jumlah besar, jangka waktu penyimpanan yang lama tanpa menghilangkan potensinya dan tanpa agen kriopreservasi beracun sehingga dapat memodifikasi efek yang diinginkan, mengurangi biaya serta waktu produksi dan pemeliharaan terapi berbasis sel (Rhatomy *et al.*, 2020).

Dalam regenerasi tulang, sel punca dan sitokin telah terbukti menjadi bahan yang berperan untuk meregenerasi sel tulang. Metabolit sel punca mesenkimal mengandung *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A), dan *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) yang berperan dalam proses regenerasi tulang yaitu pada sel punca mesenkimal *host*

dengan meregulasi migrasi sel, angiogenesis, dan osteogenesis. Secara *in vitro*, metabolit sel punca terbukti meningkatkan migrasi sel, mengekspresikan protein angiogenik serta osteogenik seperti *angiopoietin 1*, VEGF, *collagen I*, *osteocalcin*, RUNX2 dan secara *in vivo* terbukti berperan dalam proses regenerasi tulang dan jaringan periodontal (Katagiri *et al.*, 2017).

Pada kultur sel, jumlah pasase sel merupakan faktor penting. Setiap populasi sel mengalami pembelahan maka adanya indikasi sel mengalami pertambahan usia. Pertambahan usia pada sel memiliki arti yang berbeda tergantung dari *cell line* yang digunakan. Pasase merupakan deskriptor yang penting bagi sel primer. Masing-masing sel memiliki batasan usia dan diharapkan dapat berubah pada titik tertentu. *Cell line* bersifat immortal tetapi seiring meningkatnya pasase maka kesehatan sel akan menurun (Kwist *et al.*, 2016). Chouaib *et al.*, pada tahun 2022 menyatakan bahwa pengaruh dari jumlah pasase sel terhadap sekresinya belum pernah diteliti sebelumnya. Adapun Miura-Yura *et al.*, pada tahun 2020 menyatakan bahwa pengaruh konsentrasi *growth factor* yang disekresikan oleh metabolit dimana konsentrasi VEGF pada penelitiannya dengan penelitian sebelumnya berbeda seiring dengan berubahnya pasase (Miura-Yura *et al.*, 2020; Chouaib *et al.*, 2022).

Senyawa alami telah terbukti memberikan hasil yang menjanjikan dalam pengobatan serta pencegahan penyakit periodontal. Teh hijau merupakan salah satu minuman yang populer dengan kandungan utama flavonoid yaitu *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) (Vargas-Sanchez *et al.*, 2020). Teh hijau menjadi pusat perhatian dalam beberapa dekade akibat dari manfaat kesehatannya yang beragam (Liu *et al.*, 2019). Kandungan katekin tinggi merupakan komponen utama dari polifenol terbukti sebagai sumber yang berpotensi untuk meningkatkan kesehatan. Sumber

flavonoid yang terkandung dalam teh hijau diklasifikasikan sebagai katekin (C), *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG) dan *epicatechin* (EC) (Das *et al.*, 2014). Asam galat (GA) serta asam fenolik juga terkandung dalam teh hijau, yaitu asam klorogenik, asam kafein, dan flavonoid (kaempferol, myricetin, dan quercetin) (Saryono, 2013).

EGCG memiliki berbagai efek biologis terhadap tubuh termasuk sifat sitostatik untuk perkembangan sel, antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, dan antikarsinogenik (Jung *et al.*, 2011). EGCG dilaporkan memiliki manfaat untuk metabolisme tulang dan studi lain menyatakan EGCG dapat mengurangi aktivitas menginduksi apoptosis osteoklas sehingga resorpsi tulang terhambat (Liu *et al.*, 2019). Polifenol pada teh hijau mampu meningkatkan kepadatan tulang dan menurunkan resiko *bone loss* akibat faktor sistemik maupun lokal (Vargas-Sanchez *et al.*, 2020). EGCG dapat meningkatkan ekspresi mRNA dari RUNX2, *Osterix*, *Osteocalcin* (OC), dan *Alkaline Phosphatase* (ALP). EGCG berperan dalam meningkatkan aktivitas mineralisasi tulang melalui mekanisme yang diperantarai RUNX2 dan meregulasi diferensiasi sel osteoblas melalui peningkatan kadar RUNX2, BSP, dan OPN (Mah *et al.*, 2014).

Pada penelitian Novilla *et al.*, tahun 2017, dilakukan uji sitotoksitas EGCG dengan melihat viabilitas *lipopolysaccharide-induced murine macrophage cell line* (RAW 264.7) melalui uji MTT dengan dosis EGCG sebesar 10, 50, dan 100  $\mu\text{M}$ . Hasil menunjukkan pada dosis 10 dan 50  $\mu\text{M}$ , viabilitas sel RAW 264.7 lebih dari 90%, sedangkan pada dosis 100  $\mu\text{M}$  menunjukkan efek sitotoksik dengan viabilitas sel menurun sebesar 37,30% (Novilla *et al.*, 2017).

Dalam pengembangan biomaterial harus bersifat biokompatibel. Biokompatibilitas adalah bahan tidak toksik dan tidak merugikan secara biologis. Selain itu, biokompatibilitas sekarang dikaitkan dengan bioaktivitas dimana suatu bahan biomaterial mampu menghasilkan respon seluler atau jaringan yang menguntungkan (Giacomo *et al.*, 2020). Dalam melihat biokompatibilitas suatu bahan dapat melalui sitotoksitas, mutagenitas, serta potensi keganasannya. Uji sitotoksitas dapat menjadi uji awal untuk mengetahui derajat toksisitas suatu bahan dimana bahan dinyatakan bisa diterima oleh *host*, tidak mengiritasi, tidak karsinogenik, serta tidak menyebabkan alergi dengan melihat nilai viabilitas (Wiyono, 2018). Metode uji sitotoksitas menggunakan uji *3-(4.5-dimethylthiazole-2-yl)2.5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) yang merupakan *gold standard* yang sering digunakan sebagai uji biokompatibilitas (Prahasanti, Wulandari, *et al.*, 2018). Uji viabilitas dengan uji MTT pada kultur sel dilakukan untuk melihat jumlah sel aktif secara metabolik untuk perkiraan jumlah sel yang hidup berdasarkan reduksi garam tetrazolium tidak berwarna menjadi formazan berwarna. Penyerapan warna formazan berkaitan dengan jumlah sel yang hidup dalam sampel (Pascua-Maestro *et al.*, 2018; Stockert *et al.*, 2018; Buranaamnuay, 2021). Parameter sitotoksik yang digunakan dalam melihat viabilitas sel adalah dengan CD50 dimana zat dinyatakan toksik apabila sel yang hidup kurang dari 50% (Prahasanti, Wulandari, *et al.*, 2018).

Penelitian kombinasi metabolit SHED dan EGCG terhadap viabilitas sel osteoblas dilakukan berdasarkan keunggulan bahan metabolit SHED dan EGCG serta manfaatnya terhadap osteogenesis dengan melihat viabilitas sel melalui uji MTT. Viabilitas sel yang diteliti yaitu sel osteoblas yang merupakan sel yang

berperan dalam pembentukan tulang. Dosis EGCG yang digunakan sebesar 10  $\mu\text{M}$  dan 50  $\mu\text{M}$  merujuk dari Novilla *et al.*, pada tahun 2017 yang menyatakan bahwa dosis tersebut tidak toksik serta dengan 2 bahan EGCG yaitu ChemFaces® dan Meditea®. Kombinasi metabolit SHED dan EGCG diharapkan dapat menjadi alternatif bahan biomaterial osteogenesis.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah sel osteoblas memiliki viabilitas terhadap pemberian kombinasi metabolit SHED dan EGCG?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui viabilitas sel osteoblas terhadap pemberian kombinasi metabolit SHED dan EGCG.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- a. Untuk menghitung viabilitas sel osteoblas terhadap pemberian kombinasi metabolit SHED dengan EGCG 10  $\mu\text{M}$  pada uji MTT.
- b. Untuk menghitung viabilitas sel osteoblas terhadap pemberian kombinasi metabolit SHED dengan EGCG 50  $\mu\text{M}$  pada uji MTT.
- c. Untuk membandingkan viabilitas sel osteoblas terhadap pemberian kombinasi metabolit SHED dengan EGCG 10  $\mu\text{M}$  dan kombinasi metabolit SHED dengan EGCG 50  $\mu\text{M}$  pada uji MTT.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Manfaat teoritis penelitian ini untuk memberikan informasi ilmiah dan sebagai dasar teori pengembangan kombinasi metabolit SHED dengan EGCG sebagai biomaterial osteogenesis.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Manfaat praktis penelitian ini untuk mengembangkan bahan biomaterial sebagai terapi alternatif proses osteogenesis dari kombinasi metabolit SHED dengan EGCG.