

## PENGARUH SUSU IBU HAMIL TERHADAP EKSPRESI *KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASE-4 (KLK-4)* PADA SEL AMELOBLAS DALAM TUMBUH KEMBANG GIGI

(Studi terhadap Gigi Janin Mencit *Mus Musculus L.*)

Salma Samia\*, Sandy Christiono\*\*, Rina Kartika Sari\*\*\*

\* Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

\*\* Departemen Kedokteran Gigi Anak Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung,

\*\*\* Departemen Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

Korespondensi: [sandy@unissula.ac.id](mailto:sandy@unissula.ac.id)

### Keywords:

*Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4), Pregnancy milk, Tooth development*

### ABSTRACT

**Background:** Tooth development during the embryonic period is a complex process that needs enough nutrition for the formation of healthy dental tissue. Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4) is a serine proteinase secreted by ameloblast during transition and maturation stages in the amelogenesis process which functions to degrade protein matrices so enamel could reach the final hardness. Pregnancy milk contains various nutrients that can increase KLK-4 expression of ameloblast cells in the tooth development. This study aims to determine the impact of pregnancy milk against the KLK-4 expression of ameloblast cell in the tooth development process.

**Method:** 12 pregnant female mice (*Mus Musculus L.*) divided into control group (given sterile aquadest) and treatment group (given pregnancy milk + sterile aquadest) for 18 days then the tooth germ was taken. Samples were stained to see the KLK-4 expression. Data were analyzed using an Independent sample t-test.

**Result:** Our study showed that the average amounts of KLK-4 expression in the treatment group are higher than the control group. Based on the Independent sample t-test statistic methods, there is a significant difference with the value of  $p=0,017$ .

**Conclusion:** The pregnancy milk could influence the Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4) expression of ameloblast cell in the mice fetus's tooth development.

### PENDAHULUAN

Pertumbuhan dan perkembangan gigi pada masa embrio merupakan fase yang sangat penting untuk mendapatkan benih gigi yang dapat berkembang sesuai bentuk dan fungsi normalnya<sup>1</sup>. Perkembangan gigi atau odontogenesis merupakan proses kompleks terbentuknya jaringan gigi yang dimulai sejak dalam kandungan sekitar 28 hari intra uterin<sup>2</sup>. Salah satu proteinase yang berperan dalam tahap pembentukan enamel adalah *Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4)*. *KLK-4* merupakan serine proteinase yang disekresikan ameloblas selama tahap transisi dan maturasi dalam

proses amelogenesis yang berfungsi mendegradasi protein matriks sehingga enamel mencapai kekerasan akhir<sup>3</sup>.

Susu ibu hamil mengandung berbagai nutrisi yang diperlukan dalam proses pembentukan dan perkembangan gigi seperti protein, kalsium, fosfor, vitamin A, vitamin C dan vitamin D<sup>4</sup>. Peningkatan asupan kalsium selama masa kehamilan akan menyebabkan meningkatnya penyerapan kalsium dalam darah yang akan merangsang ekspresi kalsitonin yang berperan dalam meningkatkan aktifitas odontoblas dan ameloblas<sup>5</sup>. Pada penelitian Wahluyo (2013) menunjukkan

pemberian kalsium bertujuan untuk meningkatkan mineralisasi dan berperan dalam pembentukan kristal matriks enamel<sup>6</sup>. Vitamin D berfungsi untuk membantu metabolisme fosfor dan kalsium.. Vitamin A dan C berperan dalam menjaga diferensiasi sel ameloblas dalam perkembangan gigi<sup>7</sup>. Asupan nutrisi yang kurang pada masa kehamilan akan berdampak pada ukuran gigi, waktu erupsi gigi, dan defek pada mineralisasi gigi yang dapat meningkatkan resiko karies<sup>4</sup>. Susu ibu hamil yang mengandung berbagai nutrisi tersebut diharapkan dapat meningkatkan ekspresi *KLK-4* pada sel ameloblas dalam proses perkembangan gigi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh susu ibu hamil terhadap ekspresi *Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4)* pada sel ameloblas gigi janin mencit.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan No. 178/B.1-KEPK/SA-FKG//2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Terintegrasi FK UNISSULA, Unit Mikroskop Elektron dan Laboratorium Terpadu FK UNAIR, dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Sultan Agung Semarang.

Jenis penelitian ini adalah *True Experimental Laboratories* dengan *Post test only control group design*. Sampel penelitian yang digunakan berjumlah 12 ekor mencit betina (*Mus Musculus L*) yang dibagi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dimana 6 ekor mencit betina bunting diberikan aquades steril selama 18 hari, dan kelompok perlakuan dimana 6 ekor mencit betina yang sedang bunting diberikan susu ibu hamil dengan dosis

117 mg yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquades steril selama 18 hari.

Penelitian ini menggunakan beberapa instrumen yaitu kandang mencit berukuran 40cm x 30cm, tempat makanan dan minuman, pot plastik, *cotton bud*, sonde, neraca timbangan analitik, pinset anatomis, gunting bedah, spuit volume 1ml, blade dan scalpel, wadah dengan kapasitas 20cc, mikrotom, gelas objek, gelas penutup, *staining jar*, *clearing xylo*, *water bath*, dan mikroskop cahaya. Bahan yang digunakan adalah susu Prenagen® mommy moka, bahan marker *KLK-4* dari HRP-Linked Polyclonal Antibody anti *KLK-4: MBS2042557-HRP*, MyBioSource, Inc. USA, *methylene blue 1%*, aquades steril, kapas, alkohol 70%, larutan formalin 10%, dan kloroform,

Hewan uji dikawinkan dengan cara menggabungkan tiga ekor mencit betina dengan dua ekor mencit jantan dalam satu kandang. Penggabungan mencit jantan dan betina dilakukan saat mencit betina sedang mengalami fase estrus. Penentuan fase estrus dilakukan dengan mengamati hasil apusan vagina (*vaginal swab*) dibawah mikroskop pembesaran 400x yang ditandai dengan menghilangnya leukosit dan epitel berinti, digantikan dengan sel epitel bertanduk atau kornifikasi. Pengamatan *vaginal plug* dilakukan keesokan paginya dan apabila ditemukan *vaginal plug* sumbat vagina maka menandakan mencit telah berkopolasi dan memasuki hari ke-0 kebuntingan.

Pemberian dosis susu ibu hamil menggunakan perhitungan dosis berdasarkan konversi (Laurense & Bacharach 1964), konversi dosis manusia (70 kg) ke mencit (20 gr) = 0,0026. Dosis susu ibu hamil yang dianjurkan pada ibu hamil adalah 45000 mg perhari. Dosis susu ibu hamil pada mencit hamil

(20 gr) = (45000 x 0,0026) mg = 117 mg. Pada penelitian ini menggunakan dosis susu ibu hamil sebesar 117 mg yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquades steril.

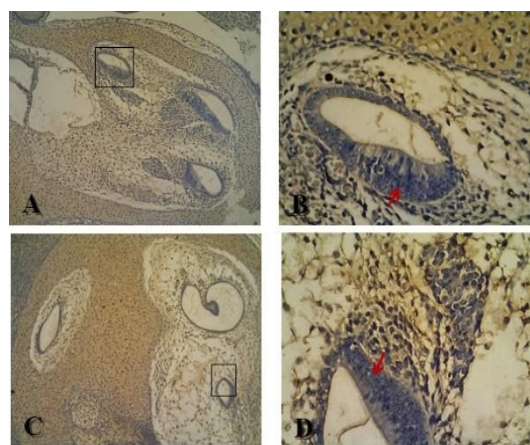
Seluruh mencit betina yang telah bunting dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dimana 6 ekor mencit betina bunting diberikan aquades steril sedangkan kelompok perlakuan dimana 6 ekor mencit betina yang sedang bunting diberikan susu ibu hamil dengan dosis 117 mg yang dilarutkan dalam 0,5 ml aquades steril. Pemberian susu ibu hamil dilakukan pada pagi (jam  $\pm 09.00$  WIB) dan sore hari (jam  $\pm 16.00$  WIB) secara oral menggunakan sonde. Pada kebuntingan hari ke-18, seluruh induk mencit dibedah dan diambil benih gigi janin. Tahap selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan histopatologis (preparat IHC) dengan menggunakan metode mikroteknik jaringan. Kemudian dilakukan pengamatan mikroskopis untuk menghitung jumlah ekspresi *KLK-4* menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera *Sigma* dengan perbesaran 100x & 400x. Perhitungan jumlah ekspresi *KLK-4* menggunakan metode *Allred Score* kombinasi *Hotspot*.

Analisis data dilakukan menggunakan uji normalitas dengan *shapiro-wilk* dan uji homogenitas dengan *levene test*. Hasil yang didapatkan adalah data terdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji *Independent sample t-test*.

## HASIL PENELITIAN

Pengamatan terhadap ekspresi *KLK-4* dilakukan melalui preparat histologi pada bagian benih gigi janin mencit yang telah diwarnai menggunakan pengecatan *Immunohistochemistry* (IHC). Ekspresi *KLK-4*

diamati dibawah mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera *Sigma* dengan perbesaran mikroskop 100x dan 400x, kemudian dihitung menggunakan metode *allred score* kombinasi *hotspot* yang memberikan reaksi positif berwarna kecoklatan pada sitoplasma terhadap antibodi polyclonal anti *KLK-4* sebagai berikut:



**Gambar 1.** Pewarnaan IHC *KLK-4*. A,B pada kelompok kontrol. C,D pada kelompok perlakuan. A,C pembesaran 100x, B,D pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan gambaran ekspresi *KLK-4* pada kebuntingan hari ke-18.

Data jumlah rata-rata ekspresi *KLK-4* tersebut disajikan dalam tabel 1.

**Tabel 1.** Rerata dan standar deviasi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terhadap jumlah ekspresi *KLK-4*.

Kelompok	Jumlah sampel	Rerata	Standar deviasi
Diberi aquades steril	6	21,1667	11,39152
Diberi susu ibu hamil + aquades steril	6	61,6667	32,86132

Pada kelompok kontrol yang hanya diberi aquades steril memiliki nilai rata-rata sebesar 21,1667 dengan standar deviasi 11,39152 sedangkan kelompok perlakuan yang diberi susu ibu hamil + aquades steril memiliki nilai rata-rata 61,6667 dan standar deviasi 32,86132.

Selanjutnya data pengamatan jumlah ekspresi *KLK-4* dilakukan menggunakan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene statistic*.

**Tabel 2.** Uji Normalitas data jumlah ekspresi *KLK-4*

Kelompok	Sig.
Diberi aquades steril	0,153
Diberi susu ibu hamil + aquades steril	0,812

Hasil analisa menunjukkan bahwa nilai *Saphiro-Wilk* pada kelompok yang diberi aquades steril dan kelompok yang diberi susu ibu hamil + aquades steril memiliki nilai signifikansi  $p > 0,05$  yang menunjukkan data tersebut terdistribusi normal. Selanjutnya data dilakukan uji homogenitas.

**Tabel 3.** Uji Homogenitas data jumlah ekspresi *KLK-4*

<i>Levene Statistic</i>	Sig.
3,049	0,111

Hasil uji homogenitas menunjukkan angka 0,111 ( $p > 0,05$ ) yang berarti bahwa data tersebut homogen sehingga dilanjutkan dengan uji *parametric* menggunakan *Independent sampel t-test*.

**Tabel 4.** Uji *Independent sample t-test*.

	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	0,017

Keterangan : signifikansi  $p < 0,05$

Hasil analisa data menggunakan uji *Independent sample t-test* didapatkan nilai  $p$  (Sig. 2-tailed) = 0,017 yang berarti nilai  $p < 0,05$ . Dari hasil tersebut didapatkan kesimpulan yaitu terdapat perbedaan yang signifikan jumlah ekspresi *KLK-4* pada kelompok yang hanya

diberikan aquades steril dan kelompok yang diberikan susu ibu hamil dan aquades steril.

## DISKUSI

Hasil akhir dari penelitian ini adalah susu ibu hamil dapat memberikan perbedaan jumlah ekspresi *KLK-4* pada sel ameloblas dalam proses amelogenesis dimana penggunaan susu ibu hamil sebagai asupan nutrisi didapatkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan yang tidak diberikan susu ibu hamil. Berdasarkan pengamatan ekspresi *KLK-4* pada Gambar 1 didapatkan bahwa terdapat perbedaan gambaran kepekatan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol terlihat lebih sedikit jumlah *KLK-4* atau lebih pudar, sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat gambaran *KLK-4* yang lebih pekat dengan jumlah *KLK-4* yang terlihat lebih banyak.

Hasil ini sesuai dengan penelitian Christiono (2019) menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi *KLK-4* pada sel ameloblas dengan pemberian serbuk ikan laut dalam proses amelogenesis<sup>8</sup>. Ikan laut mengandung berbagai nutrisi seperti protein, lemak, kalsium, dan vitamin. Kandungan nutrisi pada ikan laut tersebut hampir serupa dengan susu ibu hamil yang berpotensi meningkatkan ekspresi *KLK-4*. Amelogenesis merupakan proses pembentukan enamel yang melibatkan sel ameloblas dan terdiri dari lima tahap yaitu *presecretory*, *secretory*, *transition*, *maturation* dan *post-maturation*. Pada *maturation*, ameloblas akan mensekresikan *Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4)* yang berperan penting dalam biomineralisasi enamel gigi<sup>3</sup>.

*KLK-4* berasal dari gen cluster kallikrein yang berfungsi untuk mendegradasi protein amelogenin dari jaringan bersamaan dengan

sebagian besar protein matriks enamel lainnya dan menggantikannya dengan ion mineral seperti kalsium dan fosfor sehingga menghasilkan enamel dengan tingkat mineralisasi yang keras dan *mature*<sup>3</sup>. Pada penelitian ini pengukuran ekspresi *KLK-4* pada janin usia kebuntingan hari ke 18, dimana pada tahap tersebut sudah terjadi proses maturasi enamel dalam pembentukan matriks enamel. Hal ini dapat dilihat secara imunohistokimia, pada tahap *bell stage* yang sudah terdapat ameloblas yang akan berdiferensiasi<sup>9</sup>. Pada penelitian yang dilakukan Simmer (2011) menunjukkan adanya gangguan pada ekspresi *KLK-4* menyebabkan *hypomaturation amelogenesis imperfecta* ditandai dengan ketebalan enamel yang normal tetapi enamel mengalami hipomineralisasi dan cenderung rapuh<sup>10</sup>.

Susu ibu hamil mengandung berbagai nutrisi yang berperan penting dalam proses pembentukan gigi seperti kalsium, vitamin, fosfor, dan protein. Kalsium berfungsi untuk diferensiasi sel ameloblas dan proses mineralisasi yang nantinya akan mempengaruhi kepadatan matriks enamel<sup>6</sup>. Vitamin A dan C berperan dalam menjaga diferensiasi sel ameloblas dalam perkembangan gigi<sup>7</sup>. Vitamin D berfungsi sebagai mineralisasi gigi dan membantu metabolisme fosfor dan kalsium<sup>11</sup>. Fosfor dibutuhkan dalam pembentukan mineral gigi sehingga kekurangan fosfor dapat menyebabkan gangguan kalsifikasi pada saat perkembangan gigi<sup>4</sup>. Protein berfungsi sebagai pembentuk matriks organik tulang dan gigi yang berfungsi sebagai tempat deposisi ion mineral pada proses kalsifikasi gigi, yaitu ion kalsium dan fosfor<sup>1</sup>.

Pada masa kehamilan asupan kalsium sebanyak 30 gram ditransmisikan dari ibu ke janin. Absorpsi kalsium akan meningkat selama masa kehamilan terutama saat memasuki trimester III, yang disebabkan oleh proses mineralisasi yang cepat<sup>12</sup>. Susu ibu hamil yang mengandung kalsium dan berbagai macam nutrisi lainnya akan menginduksi mencit yang bunting<sup>8</sup>. Kalsium dapat menembus plasenta berikatan dengan TRPV6 yang merupakan suatu membran kanal kalsium yang mempengaruhi absorpsi kalsium di usus, selanjutnya akan di transporter oleh  $Ca^{2+}$  binding protein ke janin mencit<sup>8</sup>.  $Ca^{2+}$  akan ditangkap oleh sel ameloblas melalui *Ca<sup>2+</sup> Sensing reseptor*. FATPs meningkat dengan adanya signaling dari *Insulin Growth Factor (IGF)* yang nantinya membantu migrasi sel dari protein yang disekresikan oleh sel ameloblas dalam tahap *secretory* seperti protein amelogenin, ameloblastin, dan MMP-20<sup>8</sup>. Selanjutnya sel ameloblas akan mensekresikan *KLK-4* pada tahap *maturation* untuk mendegradasi protein amelogenin dan sekresi calbindin D28 sebagai deposisi  $Ca^{2+}$  sehingga membentuk mineralisasi dari hidroksiapatit<sup>8</sup>. Kecukupan mineral, vitamin, protein dan zat-zat gizi yang lain secara seimbang bukan hanya berpengaruh pada kesehatan ibu hamil tetapi juga berpengaruh untuk perkembangan gigi termasuk dalam meningkatkan ekspresi *KLK-4* dalam proses amelogenesis<sup>8</sup>.

Keterbatasan penelitian ini yaitu penelitian ini menerapkan pendekatan *in vivo* sehingga tidak dapat menggambarkan semua tahap pembentukan gigi secara lengkap, karena pada penelitian ini hanya dilihat pada 1 tahap yaitu *bell stage*. Pembentukan gigi pada mencit dimulai pada hari ke-13 *bud stage*, hari ke-14 *cap stage* dan hari ke-18 *bell stage*<sup>9</sup>. Selain itu,

penelitian mengenai perkembangan gigi pada masa prenatal belum terlalu banyak sehingga menimbulkan sedikit kesulitan untuk menemukan referensi.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh kesimpulan yaitu pemberian susu ibu hamil memberikan pengaruh yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi *Kallikrein-related peptidase-4 (KLK-4)* pada sel ameloblas dalam proses tumbuh kembang gigi janin mencit.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Aryati E, Dharmayanti AWS. Manfaat Ikan Teri Segar (*Stolephorus Sp*) Terhadap Pertumbuhan Tulang Dan Gigi. *ODONTO Dent J*. 2014;1(2):52–6.
2. Shita ADP, Sulistiyani. Pengaruh Kalsium Terhadap Tumbuh Kembang Gigi Anak. *Stomatognatic (J.K.G Unej)*. 2010;7(3): 40–44.
3. Bartlett JD. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. *ISRN Dentistry*. 2013;5(2):1–24.
4. Andriany P. Nutrisi Pada Pertumbuhan Gigi Pra Erupsi. *J Kedokteran Syiah Kuala*. 2008;(1): 57–60.
5. Sari RP, Revianti S, Prabowo PB. Diet bubuk cangkang *Anadara granosa* dan susu kedelai meningkatkan kekerasan permukaan gigi. *J Material Kedokteran Gigi*. 2012;1(1): 41–49.
6. Wahlyuo S. Peran Kalsium Sebagai Prevensi Terjadinya Hipoplasia Enamel (The Role of Calcium On Enamel Hypoplasia Prevention). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 2013;46(3): 113-118.
7. Almatsier S. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama; 2011.
8. Christiono S. Mekanisme Peningkatan Densitas Pada Amelogenesis Gigi Janin Mencit Dari Induk Mencit Yang Diberi Serbuk Ikan Laut (Penelitian Eksperimental Secara Invivo) [Disertai]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2019.
9. Ida YH, Nakatomi M, Harada H, Takata H, Baba O, Ohshima H. Glucose Uptake Mediated by Glucose transporter 1 is Essential For Early Tooth Morphogenesis and Size Determination of Murine Molars. *Developmental Biology*. Elsevier Inc. 2012;363(1): 52–61.
10. Simmer JP, Richardson AS, Smith CE, Bartlett JD, Hu JC, Hu Y. Effect of Kallikrein 4 Loss On Enamel Mineralization: Comparison To Mice Lacking Matrix Metalloproteinase 20. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(20): 18149-18160.
11. Ghosh A, Nagpal B, Hegde U, Nagpal J. Role of Vitamins in Oral Health & Disease : An Overview Role of Vitamins in Oral Health & Disease : an Overview. *Indian Journal Of Applied Research*. 2015;5(12): 292-295.
12. Purnasari G, Briawan D, Dwiriani CM. Calcium Intake and Calcium Adequacy among Pregnant Women in Jember Regency. *Jurnal MKMI*. 2016;12(4): 261–268.