

MILK CONSUMPTION AFFECTS THE EXPRESSION OF AMELOGENIN IN AMELOBLAST CELLS DURING AMELOGENESIS (IN VIVO ANALYSIS OF PREGNANT MICE)

Islamy Rahma Hutami*, Rizqa Citra Dewi**, Sandy Christiono***, Rochman Mujayanto****

*Departemen Ortodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang
 **Program Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang
 ***Departemen Kedokteran Gigi Anak Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang
 ****Departemen Penyakit Mulut Masyarakat Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang

Correspondence: rahma.hutami@unissula.ac.id

Keywords:

Milk for pregnant woman;
 amelogenin;
 tooth development.

ABSTRACT

Background: Tooth development during embryonic period is complex process that needs enough nutrition for the formation of healthy dental tissue. Amelogenin are proteins that are secreted by ameloblast in the secretory stage that are important in the crystal formation and the regulation of enamel thickness. Milk consumption during pregnancy can increase the expression of amelogenin of ameloblast cell in the tooth development process. This research aims to determine the impact of milk during pregnancy against the expression of amelogenin protein of ameloblast cell in the amelogenesis.

Method: This is a true experimental laboratory research using post test only control group design. A total of 12 pregnant female mice (*Mus Musculus L.*) are used and divided into 2 groups, control group (given sterile aquades) and treatment group (given pregnancy milk). The measurements of amelogenin expression are done in 18th day of pregnancy period. Data were analyzed using Independent sample of T-test analysis.

Result: The result of this study showed that the average amounts of amelogenin expression in the treatment group are lower than the control group. Independent sample t-test showed that there are significant difference in the amount of amelogenin expression between the control and treatment group ($P > 0,05$)

Conclusion: The milk consumption during pregnancy influenced the amelogenin expression of ameloblast cell in the mice fetus's amelogenesis.

PENDAHULUAN

Perkembangan gigi dimulai sejak dalam kandungan sekitar 28 hari intrauterin.¹ Ektoderm dan mesoderm merupakan jaringan yang membentuk bagian gigi. Pembentukan enamel dibentuk oleh ektoderm dan pembentukan dentin, sementum, serta pulpa dibentuk oleh mesoderm.² Pada tahap pembentukan enamel (amelogenesis) yang secara umum dibagi dalam empat tahap, yaitu prescretory, secretory, transition, maturation.

Ameloblast merupakan lapisan sel tunggal melapisi enamel yang sedang berkembang dan berperan pada komposisi enamel.² Matriks enamel akan dideposisikan dan termineralisasi setelah proses amelogenesis selesai, sehingga enamel akan mencapai proses maturasi ketika proses mineralisasi terjadi.³

Amelogenin adalah protein hidrofobik yang diekspresikan oleh ameloblast selama tahap sekresi hingga tahap pasca sekrestori yang terdiri dari 80-90% dari total keseluruhan protein.⁴ Amelogenin berperan dalam pembentukan prisma hidroksiapatit

dan untuk memproduksi ketebalan normal enamel, sehingga struktur enamel hampir sepenuhnya anorganik.⁴

Penelitian ini bertujuan untuk untuk mengetahui pengaruh susu ibu hamil terhadap ekspresi protein amelogenin pada sel ameloblas dalam tumbuh kembang gigi janin mencit. Manfaat penelitian ini adalah memberikan pengetahuan tentang pengaruh konsumsi susu selama kehamilan terhadap ekspresi protein amelogenin pada sel ameloblas dalam tumbuh kembang gigi janin mencit.⁵

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung Semarang dengan No. 111/B.1-KEPK/SA-FKG/VIII/2019. Penelitian dilakukan di IBL FK Unissula, Laboratorium Terpadu UNAIR, dan Laboratorium Patologi Anatomi RSI Sultan Agung Semarang.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah True Experimental dengan post test only control design. Jumlah sampel penelitian 12 ekor mencit betina bunting yang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol berupa pemberian aquades steril dan kelompok perlakuan berupa pemberian susu selama kehamilan (*pregnancy milk*) yang dilarutkan dengan aquades steril. Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah *cotton bud*, *object glass*, mikroskop cahaya untuk membuat preparat apusan vagina, dan pinset anatomis, gunting bedah, *blade*, kapas, pot plastik, untuk pembedahan pengambilan gigi janin mencit, dan parafin, mikrotom, gelas objek dan gelas penutup, *clearing xylol*, *water bath*, mikroskop cahaya, kamera sigma untuk melakukan pewarnaan IHC serta melihat hasil penelitian.

Bahan yang digunakan adalah susu ibu hamil, bahan marker Amelogenin dari Antibodi

monoclonal (MoAb) anti Amelogenin sc-365284 Santa Cruz Biotechnology Inc. USA, larutan alcohol 70%, 80%, 90%, 100%, larutan buffer formalin 10%, asam nitrat 2%, aquades. Setelah aklimatisasi mencit selama 1 minggu, dilakukan penentuan siklus estrus pada mencit betina dengan mengamati hasil apusan vagina (*vaginal swab*) dengan metode *smear*.

Cotton bud dibasahi dengan aquades dan dimasukkan bagian ujung dari cotton bud kedalam vagina mencit betina dan diputar secara perlahan sebanyak 2-3 putaran dengan kemiringan sudut $\pm 45^\circ$, lalu dibuat preparat, setelah itu diamati pada mikroskop. Gambaran pada mikroskop akan menunjukkan mencit yang sedang mengalami fase estrus dan yang tidak mengalami fase estrus, kemudian mencit yang mengalami fase estrus akan dikawinkan dengan cara menggabungkan empat ekor mencit betina dengan dua ekor mencit jantan dalam satu kandang. Selanjutnya dilakukan pengamatan vaginal plug dilakukan pada keesokan paginya dan apabila ditemukan vaginal plug maka menandakan mencit telah berkopulasi dan memasuki hari ke-0 kebuntingan.

Tahap selanjutnya, mencit yang telah bunting tersebut dipisahkan dalam kandang tersendiri. Pada kelompok kontrol mencit bunting hanya diberi aquades steril, sedangkan kelompok perlakuan mencit bunting diberi susu ibu hamil yang dilarutkan dengan aquades steril. Dosis susu ibu hamil pada mencit bunting (20 gr) = $(45000 \times 0,0026)$ mg = 117 mg. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 117 mg susu ibu hamil yang dilarutkan dengan 0,5 ml aquades steril.

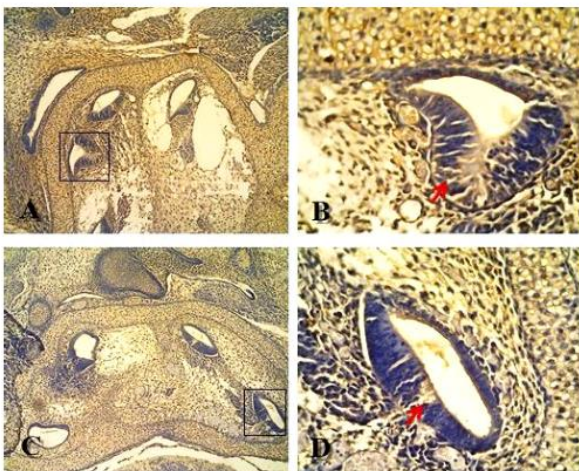
Pada hari ke-18 kebuntingan, mencit bunting dilakukan pembedahan untuk pengambilan janin mencit. Setelah dilakukan pengambilan janin mencit, dilanjutkan pembedahan pada bagian kepala janin secara

sagital dan dilakukan pembuatan sediaan histopatologis.

Kemudian, dilakukan pengamatan mikroskopis untuk menghitung jumlah ekspresi protein amelogenin menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 100 dan 400 kali. Pengamatan preparat dihitung menggunakan metode allred score dan hotspot. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji normalitas shapiro-wilk dan uji homogenitas levene test. Hasil data yang diperoleh adalah terdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji Independent sampel T-test.

HASIL PENELITIAN

Pengamatan terhadap jumlah ekspresi protein amelogenin dilakukan melalui preparat histologi pada gigi janin mencit yang telah diwarnai menggunakan pengecatan Immunohistochemistry (IHC). Ekspresi protein amelogenin diamati dibawah mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera Sigma dengan perbesaran 100x dan 400x dan akan tampak berwarna kecoklatan sebagai berikut :



Gambar 1. Pewarnaan imunohistokimia protein amelogenin dengan perbesaran 100x (A) kelompok kontrol (hanya diberi aquades steril) (B) kelompok perlakuan (diberi susu ibu hamil). Pewarnaan imunohistokimia protein amelogenin dengan perbesaran 400x (C) kelompok kontrol (hanya diberi aquades steril) (D) kelompok perlakuan (diberi susu ibu hamil). Tanda panah merah menunjukkan gambaran ekspresi amelogenin pada gigi janin mencit kebuntingan ke-18 hari.

Data jumlah rata-rata ekspresi RUNX2 tersebut ditunjukkan pada tabel 1. dibawah ini.

Tabel 1. Rata-rata dan standar deviasi kelompok kontrol (aquades steril) dan kelompok perlakuan (susu ibu hamil dan aquades steril) terhadap jumlah ekspresi amelogenin.

Kelompok	Jumlah Sampel	Rata - Rata	Std. Deviasi
Aquades steril	5	78,7000	11,57368
Aquades steril + Susu ibu hamil	5	48,0000	10,70047

Pada kelompok kontrol yang hanya diberi aquades steril memiliki nilai rata-rata sebesar 78.7 dengan standart deviasi 11.57 sedangkan kelompok perlakuan yang diberi susu ibu hamil memiliki nilai rata-rata 48, dan standart deviasi 10.7.

Data pengamatan jumlah ekspresi amelogenin dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk test dan uji homogenitas menggunakan levene statistic.

Tabel 2. Uji Normalitas data jumlah ekspresi amelogenin

Kelompok	Sig.
Aquades steril	0,150
Aquades steril + Susu ibu hamil	0,170

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

Tabel 3. Uji Homogenitas data jumlah ekspresi amelogenin

Kelompok	Sig.
Aquades steril	0,150
Aquades steril + Susu ibu hamil	0,170

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

Tabel 3. Uji Homogenitas data jumlah ekspresi amelogenin

Levene Statistic	Sig.
0,186	0,678

Hasil uji homogenitas menunjukkan angka 0,678 ($p > 0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut homogen. Dari data tersebut ditunjukkan data yang terdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan dengan uji parametric yaitu dengan independent sampel T-test.

Tabel 4. Uji Independent sampel t-test.

	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	0,002

Keterangan : signifikansi $p < 0,05$

Hasil analisa data dengan uji Independent sampel t-test menunjukkan nilai $p = 0,002$ yang berarti nilai $p < 0,05$. Sehingga dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah ekspresi RUNX2 pada kelompok kontrol yang hanya diberi aquades steril dan kelompok perlakuan yang diberi susu ibu hamil.

DISKUSI

Uji statistik parametric Independent sampel T-test yang telah dilakukan menunjukkan nilai signifikansi 0,002 yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dan perlakuan. Pada uji statistik yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian susu ibu hamil memiliki pengaruh yang signifikan terhadap jumlah ekspresi amelogenin. Pada efektivitas hasil juga ditunjukkan pada penelitian (Wahluyo, 2013) bahwa ekspresi amelogenin memiliki nilai rendah jika diberikan pajanan kalsium dibandingkan dengan diberikan pajanan flourida.⁷⁻⁹

Selain itu, pada penelitian Christiono (2019) menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi amelogenin hari kebuntingan ke 18 pada sel ameloblas dengan pemberian serbuk ikan laut dalam proses amelogenesis.⁸ Ikan laut mengandung 20 gram protein, 150 gram fosfor, 2 mg zat besi, 20 gram kalsium, 4,8 gram lemak, 0,05

gram vitamin B1, 150 mg vitamin A, dan 74 gram air. Hal ini sesuai dengan penggunaan susu ibu hamil yang kandungannya hampir sama dengan ikan laut yang berpotensi menurunkan ekspresi amelogenin.¹²

Susu khusus kehamilan memiliki beberapa nutrisi penting yang dapat mempengaruhi perkembangan gigi sejak masa prenatal, diantaranya yang utama yaitu, kalsium, fosfor, dan vitamin. Nutrisi tersebut berpengaruh pada pembentukan hidroksiapatit pada perkembangan gigi prenatal. Kalsium akan membentuk dentin dan enamel pada bagian luar gigi yang merupakan mineral pembentuk hidroksiapatit setelah amelogenin terdegradasi. Fosfor merupakan mineral terbanyak setelah kalsium yang berperan dalam pentukan hidroksiapatit. Protein sebagai pembentuk matriks organik tulang dan gigi yang berfungsi sebagai deposisi ion mineral, terutama ion kalsium dan fosfor. Vitamin A dan C membantu dalam menjaga diferensiasi sel ameloblas sehingga dapat mensekresi amelogenin pada tahap secretory.¹⁰

Vitamin D digunakan untuk metabolisme kalsium dan fosfor dalam perkembangan tulang dan gigi. Protein amelogenin disekresikan oleh ameloblas pada tahap secretory, dimana sudah terjadi pembentukan matriks enamel. Hal ini dapat dilihat secara imunohistokimia, pada tahap bell stage yang sudah terdapat ameloblas yang akan berdiferensiasi. Selama perkembangan enamel, sel ameloblas akan mensekresikan kalikrein-4 pada tahap maturation. Protein tersebut sebagai degradasi dalam maturasi enamel protein amelogenin. Pada tahap ini, adanya sekresi protein lain yaitu calbindin D28 sebagai deposisi dan mineral lainnya, sehingga membentuk mineralisasi dan hidroksiapatit. amelogenin yang disekresikan selama tahap secretory akan hilang dari jaringan bersamaan dengan sebagian besar protein matriks

enamel lainnya. Protein tersebut digantikan oleh ion mineral, kalsium dan fosfor, yang akhirnya menghasilkan sepenuhnya mineralisasi enamel yang keras dan mature. Hal ini ditunjukkan berdasarkan data statistik yang menunjukkan bahwa adanya penurunan yang signifikan pada kelompok mencit bunting yang diberikan asupan ibu hamil selama 18 hari.¹¹

Proses amelogenesis tepat pada tahap secretory hingga maturation perlu dilakukan pengamatan lebih jauh. Amelogenin mulai disekresi oleh ameloblas pada tahap secretory dan akan terdegradasi oleh kallikrein-4, sehingga amelogenin menurun pada tahap maturation dan digantikan oleh mineral.

KESIMPULAN

Konsumsi susu pada saat kehamilan berpengaruh menurunkan ekspresi amelogenin pada sel ameloblas pada proses amelogenesis dalam tumbuh kembang gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Holt, R., Roberts, G. and Scully, C. (2000). ABC of oral health - Oral health and disease Oral health and disease Development of the dentition : 320.
- Bartlett, J. D. (2013). Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. ISRN Dentistry : 1–24.
- Avery, J. K. and Chiego, D. J. (2014). Essentials of Oral Histology and Embryology A Clinical Approach. 4th edn. Michigan.
- Dewi, N., Syaify, A. and Wahyudi, I. A. (2013). Effect of gestational diabetes mellitus on the expression of amelogenin in rat offspring tooth germ. Dental Journal. 46(3) : 135–139.
- Bansal, A. K., Shetty, Devi C., Bindai, R. and Pathak, A. (2012). Amelogenin : A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 16(3) : 395–399.
- Komariah, A. & Alamsyah, N. 2015. Pengaruh Pemberian Nano Kalsium dari Eksoskeleton Kepiting Bakau (Scylla sp .) Selama Masa Kebuntingan dan Laktasi terhadap Kekerasan Gigi Tikus (F1). Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS: 948-953.
- Wahluyo, S. (2013). Peran kalsium sebagai preventi terjadinya hipoplasia enamel (The role of calcium on enamel hypoplasia prevention). Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). 46(3) : 113.

- Christiono, Sandy. 2019. Mekanisme Peningkatan Densitas Pada Amelogenesis Gigi Janin Mencit Dari Induk Mencit Yang Diberi Serbuk Ikan Laut (Penelitian Eksperimental secara invivo). Disertasi (Dr.). Universitas Airlangga.
- Almatsier, S. (2011). Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Valentina, N. K., Paruntu, M. E. and Assa, Y. A. (2015). Gambaran Kadar Fosfor darah Pada Lanjut Usia 60-74 Tahun. J e-biomedik (eBM), 3(2): 630–633
- Ida-yonemochi, H., Nakatomi, M. and Harada, H. (2012). Glucose uptake mediated by glucose transporter 1 is essential for early tooth morphogenesis and size determination of murine molars. Developmental Biology. Elsevier Inc. 363(1) : 52–61.