

DENTINO
JURNAL KEDOKTERAN GIGI
 Vol II. No 1. Maret 2014

Laporan Penelitian

**LEBAR BENIH GIGI ANAK TIKUS YANG DILAHIRKAN OLEH INDUK TIKUS
 PENGIDAP DIABETES MELLITUS GESTASIONAL**

Nurdiana Dewi

Bagian Biologi Oral, Program Studi Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin-Indonesia

ABSTRACT

Background : Gestational Diabetes mellitus (DM) is glucose intolerance that begins or first detected during pregnancy. Gestational diabetes mellitus can cause complications to mother and offspring . The janin are at risk for nutritional deficiency. Nutritional deficiencies can cause decrease in the size of the tooth tissue. **Purpose :** This study aimed to determine the width of the first molar tooth germ in rat pups born to female rat with DM. **Methods :** This study used a true experimental method with post -test only design and completely randomized design. Sixteen female rats aged 2.5-3 months, body weight 150-200 g were mated and treated on day 0 of pregnancy. Group A was the control group, injected intraperitoneally with citrate buffer. Group B was DM group, injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) 40 mg / kg BW. Two rat pups born from each female rat were decapitated on day 5 after birth and taken first mandibular molar tooth germ. Histopathology procedure were performed with HE staining and tooth germ width were measured. **Results:** The average and standard deviation of of width tooth germ in the control group was (921.97 ± 85.16) μm , while the average and standard deviation of width of tooth germ in the DM group was (886.54 ± 92.76) μm. Student T - test results showed p = 0.41 (p < 0.05), which means there was no significant difference in the size of the mandibular molar tooth germ offspring. **Conclusion :** There was no difference in the width of rat pups tooth germ which born to diabetic and control female rat.

Keywords : Gestational diabetes mellitus , width of tooth germ , rat

ABSTRAK

Latar belakang: Diabetes mellitus (DM) gestasional merupakan intoleransi glukosa yang terjadi atau baru terdeteksi selama kehamilan. Diabetes mellitus gestasional dapat menyebabkan berbagai komplikasi pada ibu maupun janin. Janin yang dikandung oleh ibu pengidap diabetes mellitus beresiko mengalami kekurangan nutrisi. Kekurangan nutrisi dapat menyebabkan penurunan ketebalan jaringan gigi. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lebar gigi pada anak tikus yang dilahirkan oleh induk tikus pengidap diabetes DM. **Metode :** Penelitian ini menggunakan metode true experimental dengan post test only design dan rancangan acak lengkap. Enam belas ekor tikus betina usia 2,5-3 bulan, berat badan 150-200 g dikawinkan dan diberi perlakuan pada hari ke-0 kehamilan. Kelompok A merupakan kelompok kontrol, diinjeksi buffer sitrat intraperitoneal . Kelompok B merupakan kelompok DM diinjeksi streptozotocin 40 mg/kg BB intraperitoneal. Tikus yang lahir diambil secara acak 2 ekor dari masing-masing induk tikus dan didekapitasi pada hari ke-5 setelah dilahirkan kemudian diambil benih gigi molar 1 rahang bawah. Dilakukan pembuatan sediaan histopatologi, pewarnaan HE dan pengukuran lebar benih gigi. **Hasil:** Nilai rata-rata dan standar deviasi lebar benih gigi pada kelompok kontrol adalah (921,97 ± 85,16) μm, sedangkan rata-rata dan standar deviasi lebar gigi pada kelompok DM adalah (886,54 ± 92,76) μm. Hasil Student T-test menunjukkan p=0,41 (p <0,05), yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna pada ukuran benih gigi molar rahang bawah anak tikus. **Kesimpulan :** Tidak terdapat perbedaan pada lebar benih gigi anak tikus yang dilahirkan oleh induk tikus DM dan kontrol.

Keyword: Diabetes mellitus gestasional, lebar benih gigi, tikus

Korespondensi: Nurdiana Dewi, Bagian Biologi Oral, Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Veteran No. 128 B, Banjarmasin, KalSel, email: nurdianadewi@gmail.com

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah yang disebabkan gangguan sekresi insulin, kerja insulin, maupun keduanya. Peningkatan kadar glukosa darah kronis dapat menyebabkan berbagai kerusakan maupun disfungsi organ. Diabetes mellitus gestasional merupakan intoleransi glukosa yang terjadi atau baru terdeteksi selama kehamilan.¹ Diabetes mellitus gestasional dapat menyebabkan berbagai komplikasi pada ibu maupun janin yang dikandungnya.² Janin yang dikandung oleh ibu pengidap diabetes mellitus beresiko untuk kekurangan nutrisi. Janin akan beradaptasi terhadap kekurangan nutrisi dengan cara merubah metabolisme tubuh, sehingga mempengaruhi produksi hormon dan sensitivitas jaringan, meredistribusi aliran darah, serta memperlambat pertumbuhannya. Adaptasi terhadap kekurangan nutrisi yang terjadi pada saat perkembangan akan mempengaruhi struktur dan fungsi tubuh secara permanen.³

Perkembangan gigi merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai mekanisme antara lain induksi, morfodiferensiasi dan histodiferensiasi. Proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan interaksi sel berhubungan dengan mekanisme-mekanisme tersebut.⁴ Pembentukan dan mineralisasi gigi dimulai pada saat perkembangan janin. Kondisi intrauterin termasuk status nutrisi berperan penting dalam pembentukan, perkembangan gigi, dan mineralisasi. Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya hubungan antara malnutrisi dengan perkembangan dan erupsi gigi serta perkembangan karies selanjutnya.^{5,6} Kekurangan nutrisi juga dapat menyebabkan penurunan ketebalan jaringan gigi. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya perubahan komposisi email dan dentin.⁷ Diabetes gestasional dapat menyebabkan terjadinya hipoplasia email, keterlambatan erupsi gigi serta penurunan panjang tulang alveolar.^{8,9}

Jumlah pengidap diabetes mellitus di Indonesia tergolong tinggi. Berdasarkan RISKESDAS 2013, jumlah penduduk Indonesia umur ≥ 15 tahun yang mengidap diabetes mellitus adalah sebesar 6,9%. Berdasarkan RISKESDAS 2007, penduduk Kalimantan Selatan yang memiliki kadar glukosa 140-200 mg/dL adalah sebesar 14,7% dan memiliki kadar glukosa >200 mg/dL adalah sebesar 5%.^{10,11} Belum terdapat penelitian terhadap jumlah pengidap diabetes mellitus gestasional di Indonesia dan Kalimantan Selatan. Penelitian yang dilakukan di Kalifornia Selatan pada tahun 1995-2005

menunjukkan bahwa 1,3% wanita hamil mengidap diabetes mellitus sejak sebelum hamil, dan 7,6% wanita hamil mengidap diabetes mellitus gestasional.¹² Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lebar gigi pada anak tikus yang dilahirkan oleh induk tikus pengidap diabetes mellitus.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan *post test only design* dan rancangan acak lengkap. Perlakuan terhadap hewan dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pegujian Terpadu Unit IV Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dilanjutkan dengan pemeriksaan histologis di Laboratorium Histologi dan Biologi Sel Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, serta dinyatakan laik etik oleh Unit Etika dan Advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada melalui surat keterangan No. 415/KKEP/FKG-UGM/EC/2013. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain benih gigi molar satu rahang bawah anak tikus, *streptozotocin* (Sigma, USA), *buffer sitrat* (0,05 M, pH 4,5), eter, ketamin (Ketamil Injection, Australia), *Povidone iodine* (One Med, Indonesia), NaCl 0,09%, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Paraformaldehid 4%, EDTA 10%, *Harrys haematoxylin, eosin* dan pakan tikus standar. Alat yang digunakan adalah kandang tikus, spuit injeksi, gunting bedah, alat monitor gula darah (ACCU-CHECK, Germany), strip tes gula darah (ACCU-CHECK, Germany), pinset anatomis, pinset *chirurgis, nierbekken, microwave* (Sharp, UK), *micropipette* (Eppendorf, UK), tip *micropipette* (Eppendorf, UK), mikrotom, mikroskop cahaya (Olympus, America), dan kamera yang dihubungkan dengan komputer (Optilab, Indonesia).

Enam belas Tikus Wistar betina berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 150-200 g dipelihara dalam kandang besi selama 1 minggu, dan mendapat makanan serta minuman standar *ad libitum*. Cahaya diatur supaya tikus berada dalam kondisi 12 jam terang dan 12 jam gelap, dengan suhu 22-24°C. Tikus kemudian dikandangkan dengan tikus betina dengan perbandingan tikus jantan : tikus betina yaitu 1:4. Pada hari saat ditemukan sperma pada *vaginal smear* (kehamilan hari 0), 8 tikus diinjeksi secara intraperitoneal 40 mg *streptozotocin* (Sigma, USA) / kg BB yang dilarutkan dalam 50 mM buffer sitrat pH 4,5. Delapan ekor tikus kontrol diberi perlakuan yang sama dengan injeksi medium (buffer sitrat). Tikus ditimbang dan diukur kadar glukosa darahnya pada kehamilan hari ke 0, 7, 14, dan 19 serta dipuasakan minimal selama 8 jam sebelum diukur kadar

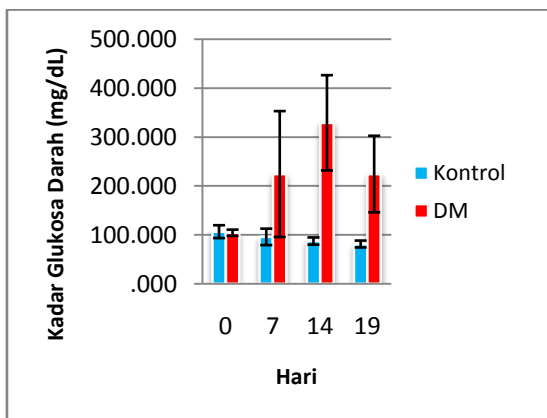
glukosanya. Tikus dinyatakan diabetes bila kadar glukosa darah lebih dari 120 mg/dL dan menunjukkan tanda-tanda polidipsi, poliuri, polifagi, serta astenia. Dua ekor anak tikus diambil dari masing-masing induk tikus secara acak dan didekapitasi pada hari ke-5 setelah dilahirkan.

Benih gigi molar diambil dan difiksasi dengan PBS formalin 4 % (4% paraformaldehid yang dilarutkan dalam *phosphate-buffer saline*) selama 24 jam, didekalsifikasi dengan EDTA 10% pada suhu 4°C selama 14 hari dan ditanam dalam parafin. Blok parafin kemudian dipotong melintang dengan ketebalan 6µm dan diletakkan dalam gelas obyek. Potongan jaringan dalam gelas obyek dideparafinisasi dengan *xylol* dan dehidrasi dengan serial alkohol, dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan hematoxilin eosin (HE). Gelas obyek yang berisi potongan jaringan dimasukkan dalam larutan hematoxilin, dicuci dengan akuades, diberi *acid alcohol*, dicuci dengan air mengalir dan akuades, diwarnai dengan eosin 1%, dan dicuci kembali dengan akuades. Dehidrasi dilakukan sampai jaringan terlihat jelas di bawah mikroskop, kemudian gelas obyek ditutup.

Jaringan dilihat dengan mikroskop perbesaran 40x, kemudian benih gigi difoto menggunakan kamera yang dihubungkan dengan mikroskop (Optilab, Indonesia). Pengukuran lebar benih gigi dilakukan dari batas benih gigi sebelah bukal sampai mesial menggunakan *ImageJ software*. Data yang didapat diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro Wilk* dan dianalisa dengan *Student T-test*.

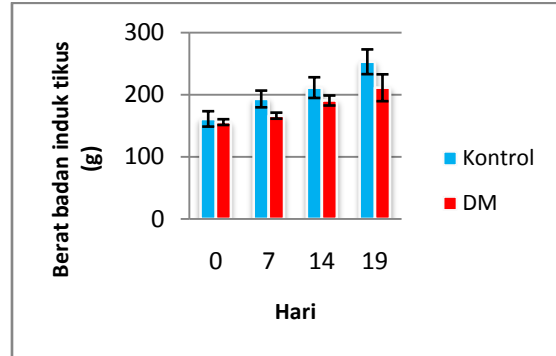
HASIL PENELITIAN

Rata-rata kadar glukosa darah puasa induk tikus dapat dilihat pada Gambar 1. Kadar glukosa darah puasa pada kelompok diabetes meningkat di atas 120 mg/kg BB setelah injeksi *streptozotocin* (STZ). Terjadi penurunan rata-rata kadar glukosa darah pada hari ke 19, namun masih tetap di atas 120 mg/kg BB. Tidak terdapat peningkatan kadar glukosa darah pada kelompok kontrol.



Gambar 1. Rata-rata kadar glukosa darah puasa induk tikus (mg/dL)

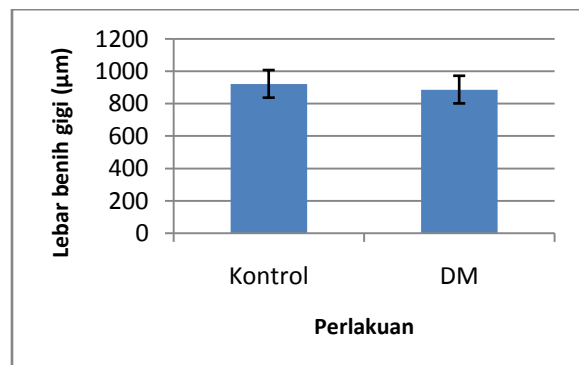
Rata-rata berat badan induk tikus dapat dilihat pada Gambar 2. Berat badan induk tikus meningkat baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok diabetes. Peningkatan berat badan pada kelompok kontrol lebih besar dibandingkan kelompok diabetes.



Gambar 2. Rata-rata berat badan induk tikus (g)

Hasil palpasi positif pada perut induk tikus pada hari ke-13 kehamilan menunjukkan adanya pembesaran pada daerah rahim yang menandakan tikus telah hamil. Induk tikus juga menunjukkan tanda klinis DM. Induk tikus mengalami polifagia, polidipsia, poliuria, dan astenia.

Gambar 3 menunjukkan rata-rata lebar benih gigi anak tikus. Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan rata-rata dan standar deviasi lebar benih gigi anak tikus kelompok kontrol adalah (921,97 ± 85,16) µm, sedangkan rata-rata lebar benih gigi anak tikus kelompok diabetes adalah (886,54 ± 92,76) µm. Rata-rata lebar benih gigi anak tikus kelompok DM lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa kedua kelompok memiliki distribusi data yang normal (p>0,05). Hasil *Student T-test* menunjukkan p=0,41 (p>0,05). Hal ini berarti tidak terdapat perbedaan bermakna antara lebar benih gigi kelompok kontrol dan kelompok DM.



Gambar 3. Rata-rata lebar benih gigi tikus (µm)

PEMBAHASAN

Terdapat peningkatan kadar glukosa darah pada kelompok DM menjadi di atas 120 mg/dL pada pengamatan hari ke 7, 14, dan 19. Kadar glukosa darah pada kelompok kontrol tidak mengalami peningkatan. Peningkatan kadar glukosa darah kemungkinan disebabkan kematian sel beta pankreas. *Streptozotocin* (STZ) menyebabkan kematian sel beta pankreas secara selektif dengan metilasi DNA. Nitrosuria pada STZ menyebabkan toksisitas sel dengan menurunkan jumlah NAD^+ dan produksi radikal bebas. Radikal bebas yang dilepaskan oleh STZ menyebabkan kerusakan DNA. *Streptozotocin* juga dapat memproduksi *Reactive Oxygen Species* dan menyumbangkan *Nitric Oxide* (NO). Kematian sel beta pankreas menyebabkan menurunnya kemampuan pankreas untuk memproduksi insulin, sehingga terjadi penumpukan glukosa dalam darah yang terdeteksi dengan peningkatan kadar glukosa darah.¹³

Pengamatan visual yang dilakukan pada tikus menunjukkan tikus mengalami tanda-tanda DM seperti penelitian Carvalho *et al.*, yaitu polidipsia (banyak minum), poliuria (banyak kencing), polifagia (banyak makan) dan astenia (lemas).¹⁴ Jumlah makanan dan minuman tidak dikur secara khusus dengan timbangan, namun dapat dilihat dari jumlah dan frekuensi makan pada kelompok DM lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol. Volume urin juga tidak diukur dengan alat ukur, namun dapat dilihat dari tempat kotoran tikus kelompok DM yang lebih banyak dan lebih basah dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa terdapat peningkatan berat badan induk tikus baik pada kelompok DM maupun pada kelompok kontrol. Peningkatan berat badan tikus pada kelompok kontrol lebih besar dibandingkan kelompok DM. Hal ini kemungkinan disebabkan kondisi DM yang dialami tikus. Frekuensi dan jumlah konsumsi makan tikus DM lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol, namun adanya gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein menyebabkan tubuh tikus tidak dapat menggunakan makanan yang dikonsumsi menjadi sumber nutrisi.^{15,16} Peningkatan berat badan pada DM yang lebih rendah dibandingkan kontrol dapat juga disebabkan karena jumlah janin yang lebih sedikit dibandingkan kontrol.¹³ Pada penelitian ini jumlah tikus yang dilahirkan oleh induk tikus kelompok DM lebih sedikit dibandingkan yang dilahirkan oleh induk tikus kelompok kontrol. Kehamilan pada induk tikus diketahui dengan adanya peningkatan berat badan pada tiap pengamatan dan palpasi positif pada bagian perut tikus pada kehamilan hari ke-13. Pembesaran pada bagian perut tikus menandakan bahwa terdapat sejumlah janin pada rahim tikus.¹⁷

Hasil pengukuran lebar benih gigi tikus menunjukkan bahwa lebar benih gigi tikus pada kelompok DM lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol, namun hasil statistik dengan *Student T test* tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Hal ini kemungkinan disebabkan karena peningkatan kadar glukosa darah pada kelompok DM tidak terlalu tinggi, sehingga tidak terlalu berpengaruh terhadap proses pembentukan ukuran benih gigi tikus. Malnutrisi yang dialami tikus pada penelitian ini tidak parah sehingga tidak mempengaruhi ukuran benih gigi. Anak tikus yang dilahirkan oleh induk tikus DM pada penelitian ini mengalami malnutrisi terlihat dengan ukuran dan berat badan yang lebih kecil, namun anak tikus yang mengalami malnutrisi parah sebagian besar mati setelah dilahirkan. Anak tikus yang hidup mengalami malnutrisi yang tidak parah.

Semakin tinggi kadar glukosa dalam darah akan menyebabkan malnutrisi yang semakin parah, karena peningkatan kadar glukosa darah menandakan kemampuan tubuh dalam memetabolisme karbohidrat, lemak, dan protein sebagai sumber energi semakin rendah. Gangguan metabolisme yang dialami induk tikus dapat menyebabkan malnutrisi energi protein pada anak tikus. Malnutrisi dapat mempengaruhi proses pembentukan gigi. Nutrisi diperlukan pada masa pre erupsi dalam maturasi gigi, penentuan komposisi gigi, serta penentuan bentuk dan ukuran gigi.¹⁸ Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Garn *et al.* yang menunjukkan adanya peningkatan ukuran gigi pada tikus yang dilahirkan oleh induk tikus DM. Pada penelitian Garn *et al.*, anak tikus yang dilahirkan memiliki berat dan ukuran badan yang lebih besar, disebabkan karena banyaknya glukosa yang ditransfer ke janin pada saat hamil.¹⁹ Terjadi peningkatan GLUT-1 dalam plasenta pada kasus diabetes mellitus gestasional. GLUT-1 juga berperan dalam pembentukan benih gigi, sehingga peningkatan GLUT-1 dapat meningkatkan ukuran benih gigi.^{20,21}

Tidak adanya perbedaan bermakna pada ukuran benih gigi kemungkinan disebabkan pengukuran dilakukan pada benih gigi pada tahap bell akhir. Pada tahap ini bentuk dan ukuran gigi belum sempurna. Pada tahap bell akhir terjadi pembentukan email dan dentin. Pembentukan benih gigi masih akan berlanjut sampai tahap aposisi selesai dan gigi mulai erupsi.^{22,23} Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan pada lebar benih gigi anak tikus yang dilahirkan oleh induk tikus DM. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan kadar glukosa induk tikus yang lebih tinggi dan pengukuran langsung pada gigi anak tikus yang telah erupsi.

DAFTAR PUSTAKA

1. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008 ; 21(1): s55-60
2. Vedavathi KJ, Swamy RM, Kanavi RS, Venkatesh G, Veeranna HB. Influence of gestational diabetes mellitus on fetal growth parameter. *Int J Biol Med Res* 2011; 2(3): 832-834
3. Barker DJP. The malnourished baby and infant. *British Medical Buletin* 2001; 60: 69-88
4. Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* 1999; 264: 672-686
5. Tanaka K, Miyake Y, sasaki S, Hirota Y. Dairy products and calcium intake during pregnancy and dental caries in children. *Nutrition Journal* 2012; 11: 33-40
6. Alvarez JO. Nutrition, tooth development, and dental caries. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(suppl): 410s-6s
7. Rocha JS, Baldani MH, Lopes CMDL. Impact of prenatal protein-calorie malnutrition on the odontogenesis of wistar rats. *Braz Dent Sci* 2013; 16(3): 63-9
8. Dewi N. Pengaruh diabetes mellitus gestasional terhadap ekspresi amelogenin dan histomorfologi benih gigi anak tikus. Tesis. 2013
9. Villarino ME, Goya JA, De Lucca RC, Ubios AM. Alterations of tooth eruption and growth in pup suckling from diabetic dams. *Pediatr Res* 2005; 58(4): 695-9
10. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Kesehatan RI. Riset kesehatan dasar 2013
11. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Riset kesehatan dasar (RISKESDAS) 2007. 2008
12. Lawrence JM, Contreras R, Chen W, Sacks DA. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. *Diabetes Care* 2008; 31:899-904
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-226
14. Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Braz* 2003; 18:60-64
15. Kiss ACI, Lima PHO, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MVC, Damasceno DC. Animal Models for Clinical and Gestational Diabetes : Maternal and Fetal Outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1:21
16. Hall JE. Insulin, Glucagon, and Diabetes Mellitus. In: Guyton and Hall Text Book of Medical Physiology. 12th ed. Philadelphia : Elseviers Saunders; 2011. p.939-954
17. Ypsilantis P, Deftereos S, Prassopoulos P, Simopoulos C. Ultrasonographic Diagnosis of Pregnancy in Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009; 48(6):734-739
18. Goncalves LA, Boldrini SC, Capote TSO, Binotti CB, Azeredo RA, Martini DT, *et al.*, Structural and ultra-structural features of the first mandibular molar of young rats submitted to pre and postnatal protein deficiencies. *The Open Dentistry Journal* 2009; 3:125-131
19. Garn SM, Osborne RH, Alvesalo L, Horowitz SL. Maternal and gestational influences on deciduous and permanent tooth. *J Dent Res* 1980; 59(2): 142-143
20. Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Harada H, Takana H. Glucose uptake mediated by glucose transporter 1 is essential for early tooth morphogenesis and size determination of murine molars. *Developmental Biology* 2012; 363: 52-61
21. Desoye G and Haugel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30(2): 120-6
22. Bath-Balogh M and Fehrenbach MJ. *Dental Embriology, Histology, and Anatomy*. 2nd ed. St Louis: Elseviers Saunders. 2006. p.61-91
23. Nanci A. *Ten Cate's Oral histology*. 7th ed. St Louis: Elseviers Saunders. 2008