



**PENGARUH HIPERGLIKEMIA INDUK TIKUS BUNTING  
DIABETIK TERHADAP BERAT BADAN, TUMBUH KEMBANG  
DAN EKSPRESI IGF-1 BENIH GIGI POSTNATAL ANAK TIKUS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Muhammad Nadhir Alkaff  
NIM 141610101064**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**PENGARUH HIPERGLIKEMIA INDUK TIKUS BUNTING  
DIABETIK TERHADAP BERAT BADAN, TUMBUH KEMBANG  
DAN EKSPRESI IGF-1 BENIH GIGI POSTNATAL ANAK TIKUS**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

**Muhammad Nadhir Alkaff**  
**NIM 141610101064**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Tuhan Yang Maha Esa, Allah SWT;
2. Orang tua saya yang sudah merawat dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang dari lahir hingga sekarang;
3. Bapak dan ibu guru yang sudah memberikan ilmunya kepada saya mulai taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

**MOTO**

Orang beriman itu bersikap ramah dan tidak ada kebaikan bagi seseorang yang tidak bersikap ramah. Dan sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia (HR. Thabrani dan Daruquthni)\*



\*) Sahih al-Albani 3289

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Muhammad Nadhir Alkaff

NIM : 141610101064

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Hiperglikemia Induk Tikus Bunting Diabetik Terhadap Berat Badan, Tumbuh Kembang dan Ekspresi IGF-1 Benih Gigi Postnatal Anak Tikus” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan, dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 8 Juni 2018

Yang Menyatakan,

Muhammad Nadhir Alkaff

141610101064

**SKRIPSI**

**PENGARUH HIPERGLIKEMIA INDUK TIKUS BUNTING  
DIABETIK TERHADAP BERAT BADAN, TUMBUH KEMBANG  
DAN EKSPRESI IGF-1 BENIH GIGI POSTNATAL ANAK TIKUS**

Oleh

**Muhammad Nadhir Alkaff  
NIM 141610101064**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Dwi Merry Ch. Robin, M.Kes

**PENGESAHAN**

Karya ilmiah Skripsi berjudul “Pengaruh Hiperglikemia Induk Tikus Bunting Diabetik Terhadap Berat Badan, Tumbuh Kembang dan Ekspresi IGF-1 Benih Gigi Postnatal Anak Tikus” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Jumat, 8 Juni 2018

tempat : Ruang Sidang Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji, Anggota,

Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S  
NIP 196104011985112001

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes  
NIP196903031997022001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D  
NIP 196805291994031003

drg. Dwi Merry Ch. Robin., M.Kes  
NIP 197712232008122002

Mengesahkan  
Dekan,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros.  
NIP 196901121996011001

**RINGKASAN**

**PENGARUH HIPERGLIKEMIA INDUK TIKUS BUNTING DIABETIK TERHADAP BERAT BADAN, TUMBUH KEMBANG DAN EKSPRESI IGF-1 BENIH GIGI POSTNATAL ANAK TIKUS;** Muhammad Nadhir Alkaff, 141610101064;2018:60 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

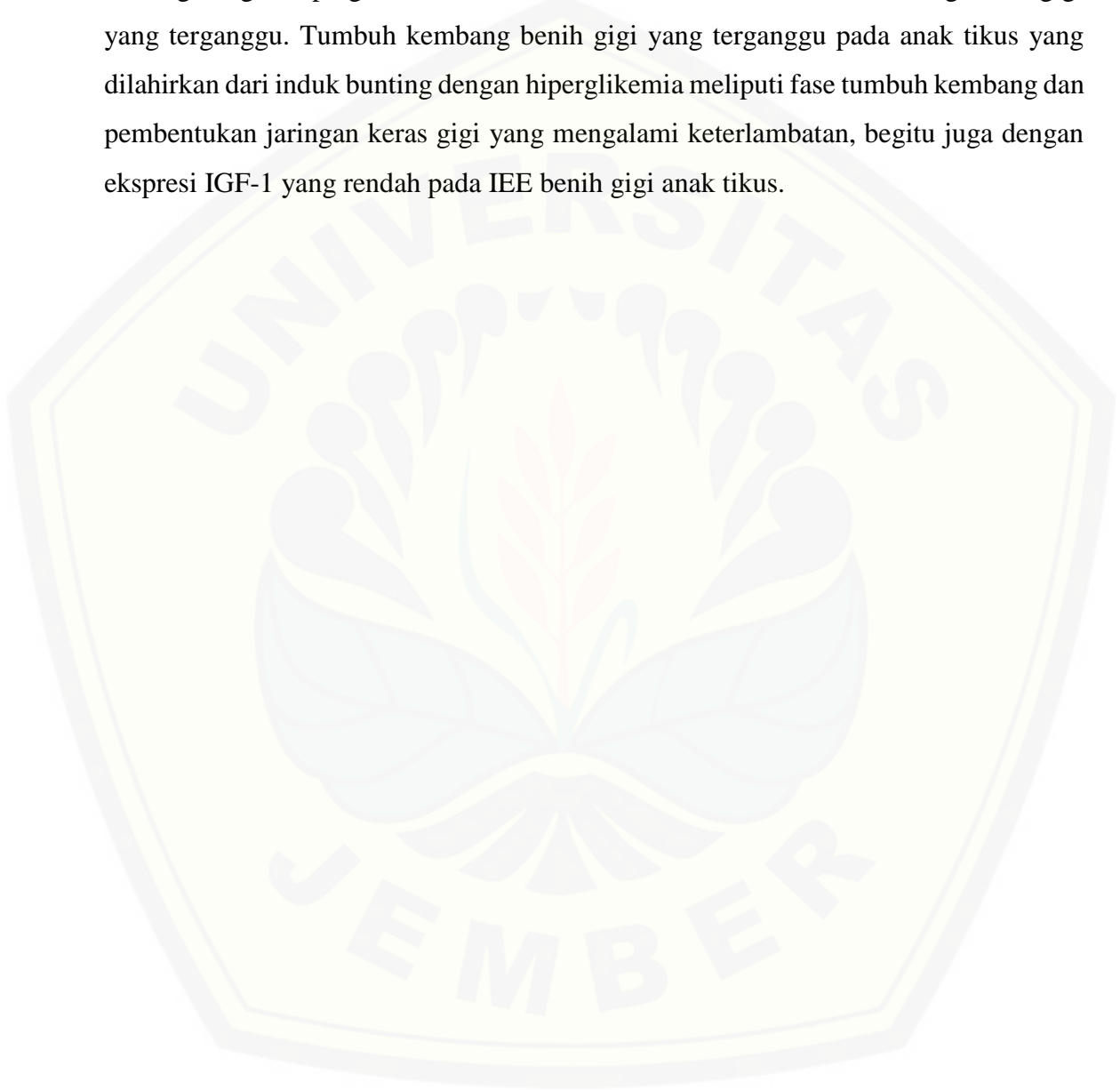
Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit kelainan metabolik dengan karakteristik kenaikan kadar glukosa darah (KGD) atau hiperglikemia kronis serta kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya. Diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes disebut dengan diabetes gestational. Hiperglikemia diabetik dapat mempercepat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan akan menyebabkan kerusakan oksidatif yang mampu merusak lipid seluler, protein maupun DNA, dan menghambat fungsi normal sel. Pada keadaan hiperglikemia diabetik juga akan terjadi peningkatan *growth hormone* (GH) dan akan terjadi penurunan kadar *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) dalam sirkulasi. Turunnya kadar IGF-1 dalam sistem sirkulasi akan menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan berbagai organ salah satunya gigi, karena IGF-1 memiliki peran penting dalam menjaga keberlangsungan hidup sel, sintesis protein, proliferasi sel, mengurangi stres oksidatif, dan mencegah kematian sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hiperglikemia induk tikus bunting diabetik terhadap berat badan dan tumbuh kembang benih gigi anak tikus (postnatal hari ke-1) yang meliputi fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi, dan ekspresi IGF-1 pada IEE dan dental papila.



Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *the post-test only control group*. Anak tikus wistar (post natal hari ke-1) jenis *Rattus norvegicus* yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 10 ekor anak tikus yang berasal dari induk tikus yang berbeda dan diambil secara *simple random sampling*. Penelitian ini menggunakan induk tikus dengan berat badan 150-250 gram, usia 2-3 bulan, kondisi bunting dengan usia bunting perkiraan 10 hari, kondisi fisik baik dan perilaku normal. Terdapat 2 kelompok yang digunakan pada penelitian ini, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 sampel anak tikus. Kelompok kontrol merupakan anak tikus yang berasal dari induk tikus yang tidak diberi perlakuan apapun dan kelompok perlakuan merupakan anak tikus yang berasal dari induk tikus yang diinduksi *streptozotocin* (STZ). KGD induk tikus diukur menggunakan glukometer pada saat sebelum induksi STZ, hari ke-1 setelah induksi STZ, dan setiap 2 hari hingga postnatal hari ke-1. Dosis STZ yang digunakan pada penelitian ini sebesar 40 mg/kg BB dan diinjeksikan secara intraperitoneal. Induk tikus dengan KGD  $\geq 200$  mg/dl dikategorikan sebagai induk tikus DM. Berat badan anak tikus ditimbang sebelum dilakukan *euthanasia* pada postnatal hari ke-1. Rahang atas (maksila) kanan anak tikus diambil untuk dilakukan pengamatan histologis pada benih gigi M1 dengan pewarnaan HE dan imunohistokimia menggunakan antibodi IGF-1.

Hasil penelitian menunjukkan berat badan anak tikus yang berasal dari induk bunting dengan hiperglikemia lebih rendah (5 gr) dibandingkan anak tikus yang lahir dari induk tikus dengan KGD normal (6 gr). Anak tikus yang dilahirkan dari induk tikus dengan hiperglikemia juga mengalami gangguan tumbuh kembang benih gigi meliputi keterlambatan fase tumbuh kembang dan pembentukan matriks jaringan keras gigi. Hasil penelitian juga menunjukkan ekspresi IGF-1 pada *inner enamel epithelium* (IEE) benih gigi anak tikus yang berasal dari induk dengan hiperglikemia lebih rendah (61,56%) dibandingkan anak tikus yang berasal dari induk tikus dengan KGD yang normal (87,90%), sedangkan pada dental papila ekspresi IGF-1 hampir sama pada anak tikus yang berasal dari induk dengan hiperglikemia (32,65%) dan anak tikus yang

berasal dari induk dengan KGD normal (31,76%). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa anak tikus yang dilahirkan dari induk bunting dengan hiperglikemia memiliki berat badan dan tumbuh kembang benih gigi yang terganggu. Tumbuh kembang benih gigi yang terganggu pada anak tikus yang dilahirkan dari induk bunting dengan hiperglikemia meliputi fase tumbuh kembang dan pembentukan jaringan keras gigi yang mengalami keterlambatan, begitu juga dengan ekspresi IGF-1 yang rendah pada IEE benih gigi anak tikus.



## PRAKATA

Assalamu'alaikum wa rahmatullahi wa barakatuh

Puji dan syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, berkah dan hidayah-Nya skripsi yang berjudul “Pengaruh Hiperglikemia Induk Tikus Bunting Diabetik Terhadap Berat Badan, Tumbuh Kembang dan Ekspresi IGF-1 Benih Gigi Postnatal Anak Tikus” dapat terselesaikan dengan baik. Shalawat serta salam juga penulis kirimkan kepada nabi Muhammad SAW, beserta sahabat, dan keluarga beliau yang telah memberikan tauladan untuk menjalani kehidupan di dunia maupun di akhirat.

Penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tana adanya bantuan dan kemurahan hati dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan banyak-banyak terimakasih kepada :

1. Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan drg. Dwi Merry Ch. Robin, M.Kes selaku dosen pembimbing pendamping yang telah membimbing, meluangkan waktu, mencurahkan pikiran dan tenaga demi terselesaikannya skripsi ini.
2. Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S selaku dosen penguji ketua dan Dr drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan masukan serta saran yang sangat membangun demi kesempurnaan dari skripsi ini.
3. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan dukungan selama menjadi mahasiswa.
4. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes Sp. Pros, selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember beserta jajarannya.
5. Semua dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya.

6. Kedua orang tua saya, ibu dr. sy. Halidah, M.kes dan bapak Ir. Nabel Alkaff yang telah mendidik saya dari kecil dan selalu memberikan doa serta dukungan.
7. Kakak kandung saya Ali Rifqi Alkaff S.ked dan adik-adik saya, Nadia Nur Shadrina, Ahmad Alkaff, dan Nisrina Ulya Azizah yang selalu memberikan doa dan dukungan.
8. Staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember; bapak Agusmurdjohadi Putradjaka, ibu Nur, bapak Bagus, dan ibu Sri Wahyuni.
9. Staf Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; bapak Wibi Wirawan, S.Si, M.Biomed dan ibu Fitri.
10. Staf Kemahasiswaan dan Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
11. Ziyana Mawaddatul Walidah dan Nawang Lintang Clearestha yang sama-sama berjuang untuk menyelesaikan tugas akhir sebagai mahasiswa Program Studi Kedokteran Gigi.
12. Saudara Aldiansyah Hakim, selaku komting mahasiswa angkatan 2014 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
13. Teman-teman kelompok tutorial 6, angkatan 2014 dan semua mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
14. Semua pihak yang namanya tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan isi skripsi ini. Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat di kemudian hari .

Jember 8 Juni 2018

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>COVER</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xviii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xx
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xxi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3

<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Diabetes Mellitus (DM)</b> .....	5
2.1.1 Definisi dan Prevalensi .....	5
2.1.2 Patomekanisme Diabetes Mellitus (DM) .....	6
2.1.3 Diabetes Mellitus pada Masa Kehamilan (Gestational) .....	8
2.1.4 Efek Hiperglikemia pada Masa Kehamilan .....	9
<b>2.2 <i>Insulin –Like Growth Factor I (IGF-1)</i></b> .....	10
<b>2.3 Pertumbuhan dan Perkembangan Gigi</b> .....	13
<b>2.4 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)</b> .....	16
2.4.1 Siklus Rproduksi Tikus Putih .....	16
2.4.2 Tumbuh Kembang Gigi Tikus Putih .....	18
<b>2.5 Imunohistokimia</b> .....	19
<b>2.6 Hipotesis Penelitian</b> .....	20
<b>2.7 Kerangka Konsep Penelitian</b> .....	21
2.7.1 Penjelasan Kerangka Konsep .....	22
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b> .....	23
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	23

<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	23
3.2.1 Tempat Penelitian .....	23
3.2.2 Waktu Penelitian .....	23
<b>3.3 Populasi dan Sampel Penelitian</b> .....	23
3.3.1 Populasi Penelitian .....	23
3.3.2 Sampel Penelitian .....	24
3.3.3 Kriteria Sampel Anak Tikus .....	25
<b>3.4 Identifikasi Variabel Penelitian</b> .....	25
3.4.1 Variabel Bebas .....	25
3.4.2 Variabel Terikat .....	25
3.4.3 Variabel Terkendali .....	25
<b>3.5 Definisi Operasional</b> .....	26
3.5.1 Tikus Bunting .....	26
3.5.2 Tikus Diabetik .....	26
3.5.3 Tumbuh Kembang Gigi .....	26
3.5.4 Pengamatan Ekspresi <i>Insulin-Like Growth Factor I</i> (IGF-1) .....	27
<b>3.6 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	27
3.6.1 Alat Penelitian .....	27
3.6.2 Bahan Penelitian .....	28
<b>3.7 Prosedur Penelitian</b> .....	29
3.7.1 Ethical Clearance .....	29

3.7.2	Persiapan Hewan Coba .....	29
3.7.3	Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba .....	29
3.7.4	Pembuatan Larutan <i>Streptozotocin</i> (STZ) .....	30
3.7.5	Induksi <i>Streptozotocin</i> (STZ) .....	30
3.7.6	<i>Euthanasia</i> Hewan Coba .....	31
3.7.7	Pembuatan Preparat Jaringan .....	31
3.7.8	Pengecatan Jaringan dengan teknik Hematoksilin-Eosin (HE) ...	33
3.7.9	Pengecatan Jaringan dengan teknik Imunohistokimia .....	34
<b>3.8</b>	<b>Pengukuran Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus .....</b>	<b>35</b>
<b>3.9</b>	<b>Prosedur Pengamatan Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan</b>	
	<b>Anak Tikus .....</b>	<b>35</b>
<b>3.10</b>	<b>Prosedur Pengamatan Ekspresi <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i></b>	
	<b>(IGF-1) .....</b>	<b>35</b>
<b>3.11</b>	<b>Analisis Data .....</b>	<b>38</b>
<b>3.12</b>	<b>Alur Penelitian .....</b>	<b>39</b>
<b>BAB 4</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Hasil .....</b>	<b>40</b>
	<b>4.1.1 Kadar Glukosa Darah (KGD) Induk Tikus .....</b>	<b>40</b>
	<b>4.1.2 Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus .....</b>	<b>41</b>
	<b>4.1.3 Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Anak Tikus .....</b>	<b>42</b>



4.1.4 Ekspresi <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i> (IGF-1) .....	45
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	48
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	54
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	54
<b>5.2 Saran</b> .....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	55
<b>LAMPIRAN</b> .....	61

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Data Biologi Umum Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	17
Tabel 4.1 KGD induk tikus bunting kelompok kontrol dan kelompok perlakuan..	41
Tabel 4.2 Rata-rata berat badan anak tikus kelompok kontrol dan perlakuan .....	42
Tabel 4.3 Hasil pengamatan ekspresi IGF-1 pada IEE dengan menggunakan aplikasi <i>ImmunoRatio</i> .....	47
Tabel 4.4 Hasil pengamatan ekspresi IGF-1 pada dental papila dengan menggunakan aplikasi <i>ImmunoRatio</i> .....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pengaturan sekresi IGF-1 pada sistem sirkulasi sebagai endokrin .....	10
Gambar 2.2 Aktifitas bioseluler IGF-1 untuk melakukan metabolisme glukosa, meningkatkan pertumbuhan, sintesis protein, proliferasi sel, dan mencegah kematian sel .....	12
Gambar 2.3 Pertumbuhan dan perkembangan gigi (odontogenesis) .....	14
Gambar 2.4 Gambaran histologis benih gigi M1 rahang bawah kanan tikus .....	18
Gambar 2.5 Benih gigi M1 rahang bawah tikus putih dengan pewarnaan imunohistokimia reaksi positif terhadap <i>glucose transporter 1</i> (GLUT 1) .....	20
Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian .....	21
Gambar 3.1 Gambaran HPA benih gigi M1 maksila kanan anak tikus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi IGF-1 diamati di bawah mikroskop perbesaran 400x .....	36
Gambar 3.2 Benih Gigi M1 maksila kanan anak tikus dengan pewarnaan imunohistokimia. pengamatan ekspresi IGF-1 dilakukan pada 1/3 distal, 1/3 tengah dan 1/3 mesial. Perbesaran 100x .....	36
Gambar 3.3 Hasil pengamatan ekspresi IGF-1 pada dental papila secara kuantitatif dengan menggunakan aplikasi <i>ImmunoRatio</i> .....	37
Gambar 4.1 Gambaran Histologis benih gigi M1 maksila anak tikus kelompok kontrol dan perlakuan dengan pewarnaan HE. Perbesaran 100x .....	43
Gambar 4.2 Gambaran histologis benih gigi M1 maksila anak tikus kelompok kontrol dan perlakuan dengan pewarnaan HE. Perbesaran 400x .....	44
Gambar 4.3 Gambaran histologis ekspresi IGF-1 pada benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok kontrol dan perlakuan dengan pewarnaan imunohistokimia perbesaran 100x dan 1000x pada lapang pandang 1, 2, dan 3 yang telah diproses menggunakan aplikasi <i>ImmunoRatio</i> .....	46

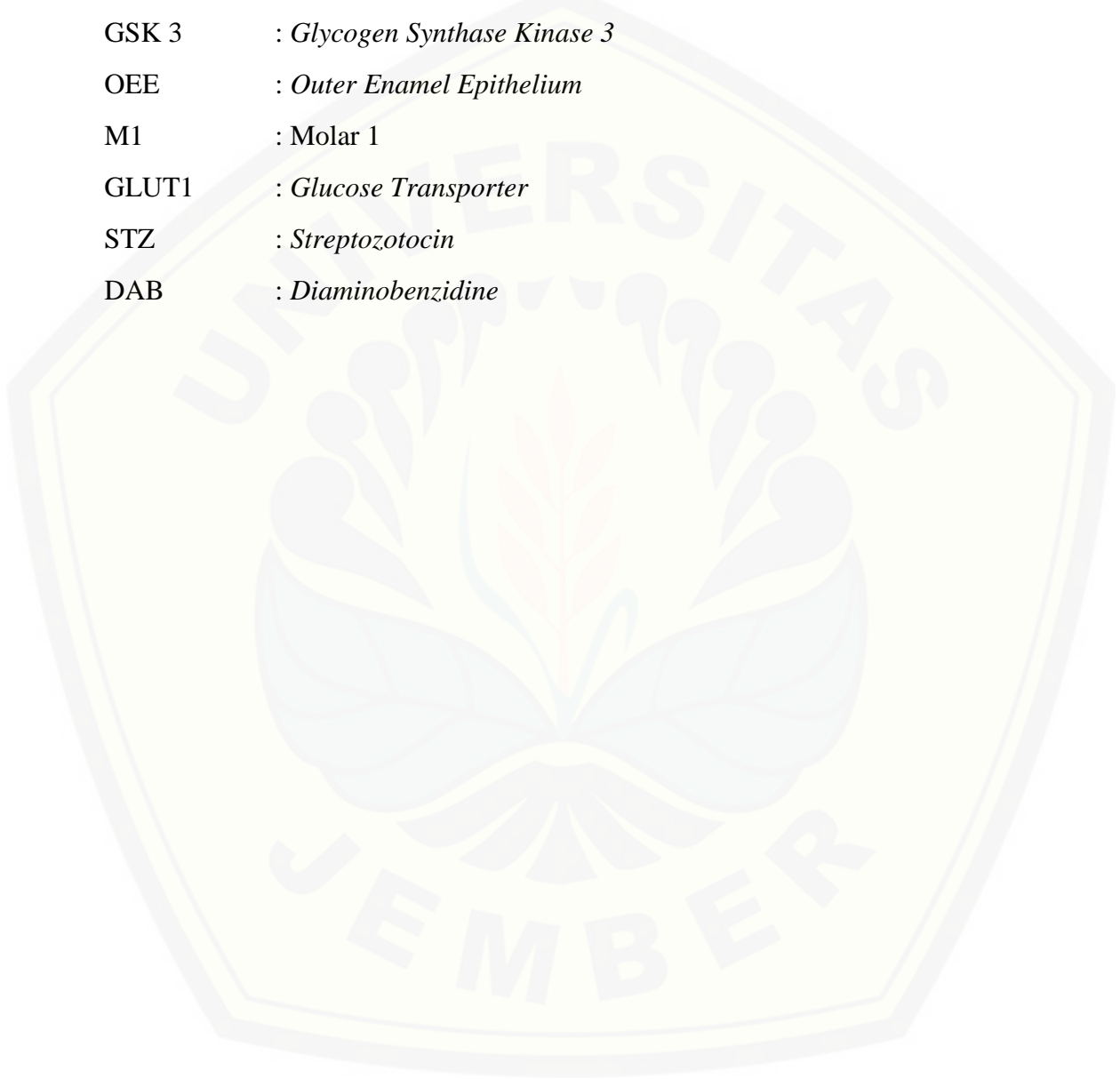
**DAFTAR LAMPIRAN**

LAMPIRAN A. Surat Keterangan Persetujuan Etik ( <i>Ethical Clearance</i> ) .....	61
LAMPIRAN B. Surat Ijin Penelitian .....	62
LAMPIRAN C. Perhitungan Dosis <i>Streptozotocin</i> .....	65
LAMPIRAN D. Alat dan Bahan Penelitian .....	66
LAMPIRAN E. Prosedur Penelitian .....	70
LAMPIRAN F. Perhitungan Rata-Rata Berat Badan Tikus .....	74
LAMPIRAN G. Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus dengan Pewarnaan HE .....	75
LAMPIRAN H. Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus dengan Pewarnaan IHC Menggunakan Antibodi IGF-1 .....	78
LAMPIRAN I. Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 Menggunakan aplikasi <i>ImmunoRatio</i> .....	85
LAMPIRAN J. Perhitungan Rata-Rata Ekspresi IGF-1 .....	100
LAMPIRAN K. Hasil Uji Analisis Data .....	101

**DAFTAR SINGKATAN**

IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
DM	: Diabetes Mellitus
KGD	: Kadar Glukosa Darah
AGEs	: <i>Advanced Glycation End Products</i>
RAGE	: <i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
PI3-K	: <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
GH	: <i>Growth Hormone</i>
IEE	: <i>Inner Enamel Epithelium</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
IDDM	: <i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>
NIDDM	: <i>Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
VCAM-1	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
IL	: Interleukin
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
PKC	: Protein Kinase C
TGF- $\alpha$	: <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i>
PAI-1	: <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
IGF-1R	: <i>Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IGFBP	: <i>Insulin-Like Growth Factor Binding Protein</i>

IRS	: <i>Insulin Receptor Substrat</i>
mTORC1	: <i>Mamalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
FOXO	: <i>Forkhead Transcription Factors</i>
GSK 3	: <i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
OEE	: <i>Outer Enamel Epithelium</i>
M1	: <i>Molar 1</i>
GLUT1	: <i>Glucose Transporter</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit kelainan metabolik dengan karakteristik kenaikan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) kronis serta kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya (WHO, 2016). DM tipe 1 merupakan keadaan hiperglikemia yang disebabkan karena gangguan sekresi insulin dimana terjadi penurunan kadar insulin dalam darah, sedangkan DM tipe 2 merupakan keadaan hiperglikemia yang disebabkan karena insulin tidak dapat bekerja dengan baik (Soegondo., 2015).

Prevalensi diabetes mellitus terus mengalami peningkatan secara global hal ini disebabkan karena adanya peningkatan kemakmuran di negara yang bersangkutan. Penelitian epidemiologi yang telah dilaksanakan di berbagai kota di Indonesia sampai tahun delapan puluhan, prevalensi diabetes berkisar 1,5-2,3%, kecuali di Manado lebih tinggi sebesar 6%. Hasil penelitian selanjutnya terus mengalami peningkatan. Tahun 1993 di Jakarta terjadi peningkatan prevalensi diabetes dari 1,7% pada tahun 1982 menjadi 5,7% pada tahun 1993, kemudian pada tahun 2001 di Depok menjadi 12,8%. Penderita diabetes khususnya DM tipe 2 diperkirakan akan meningkat drastis dalam kurun waktu 1 atau 2 dekade yang akan datang. Peningkatan tersebut disebabkan oleh beberapa faktor, seperti faktor keturunan, obesitas, gaya hidup, demografi, serta karena berkurangnya penyakit infeksi dan kurang gizi (Soegondo, 2015).

Diabetes pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes disebut dengan diabetes gestational. Sekitar 50% wanita yang mengidap diabetes tipe ini tidak akan kembali ke kondisi normal setelah kehamilan berakhir, walaupun diabetes ini dapat membaik setelah persalinan risiko untuk mengalami diabetes tipe 2 setelah sekitar 5 tahun mendatang lebih besar dari normal (Utz *et al.*, 2016). Diabetes pada kehamilan dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan

risiko malformasi kongenital, lahir mati dan bayi bertubuh besar untuk masa kehamilan yang dapat menyebabkan masalah dalam persalinan (Morisson, *et al.*, 2017).

Gangguan pertumbuhan akibat hiperglikemia diabetik pada ibu hamil yang akan dialami oleh janin dapat terjadi pada berbagai organ salah satunya diduga dapat terjadi pada proses tumbuh kembang benih gigi. Hal tersebut terjadi karena kondisi hiperglikemia akan menimbulkan stres oksidatif yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh (Ullah *et al.*, 2015). Kadar glukosa darah (KGD) yang tinggi pada ibu hamil dapat memicu terjadinya proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs (*advanced glycation end product*). Interaksi antara AGEs dalam sirkulasi dengan RAGE (*receptor for advanced glycation end product*) akan meningkatkan produksi ROS (*reactive oxygen species*) yang akan menyebabkan stres oksidatif. Kadar glukosa darah yang tinggi juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan dengan mengaktifasi protein kinase C, aktivasi jalur poliol dan melalui jalur heksosamin yang juga akan meningkatkan stres oksidatif. Stres oksidatif akan merusak lipid seluler, protein maupun DNA, dan menghambat fungsi normal sel (Newsholme *et al.*, 2016; Fakhrudin *et al.*, 2017).

Kerusakan oksidatif akibat hiperglikemia pada ibu hamil dapat mengganggu beberapa faktor pertumbuhan yang penting dalam proses tumbuh kembang gigi janin salah satunya adalah *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (Ullah *et al.*, 2015). IGF-1 merupakan hormon yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan organ dan jaringan pada rongga mulut termasuk gigi. IGF-1 merupakan mediator yang memiliki peran penting pada pertumbuhan dan differensiasi sel (Wang *et al.*, 2012). IGF-1 juga memiliki kemampuan untuk mengurangi stres oksidatif dan mencegah kematian sel melalui jalur *phosphoinositide 3-kinase* (PI3-K)/Akt (Alehagen *et al.*, 2017). Keadaan hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan *growth hormone* (GH) dan penurunan kadar IGF-1 dalam darah karena hepar membutuhkan insulin untuk dapat menerima sinyal biologis dari GH dan mensekresikan IGF-1 kedalam darah (Chiarelli *et al.*, 2004).



*Inner Enamel Epithelium* (IEE) dan dental papila merupakan jaringan embrionik gigi yang berfungsi dalam pembentukan jaringan keras gigi. IEE merupakan bagian dari enamel organ yang terdiri dari sel columnar yang akan berdiferensiasi menjadi ameloblas dan berperan dalam pembentukan enamel, sedangkan dental papila akan berdiferensiasi menjadi odontoblas dan berperan dalam pembentukan dentin (Wangidjaja, 2014). Gangguan pertumbuhan dan perkembangan *Inner Enamel Epithelium* (IEE) dan dental papila pada janin akibat kondisi hiperglikemia pada ibu hamil dapat berdampak buruk pada pembentukan jaringan keras gigi (Chen *et al.*, 2017).

Hiperglikemia pada ibu hamil dapat menyebabkan gangguan pada berat badan dan Gangguan tumbuh kembang gigi pada IEE dan dental papila yang berupa gangguan proliferasi akibat hiperglikemia akan menyebabkan gangguan pada bentuk dan ukuran gigi, sedangkan gangguan diferensiasi sel pada IEE dan dental papila akan mengakibatkan gangguan pada tahap maturasi dan kalsifikasi gigi. Gangguan maturasi dan kalsifikasi disebabkan karena kondisi hiperglikemia dapat menghambat sintesis protein matriks jaringan keras gigi (Chen *et al.*, 2017). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa IGF-1 memiliki peran penting pada sekresi matriks enamel dan pembentukan dentin tersier (Yonemochi *et al.*, 2016; Matsumura *et al.*, 2017). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi amelogenin pada anak tikus yang dilahirkan pada induk yang mengalami hiperglikemia diabetik dan dapat menyebabkan gangguan pembentukan matriks enamel gigi (Dewi *et al.*, 2013). Namun, belum banyak penelitian yang dilakukan untuk melihat pengaruh hiperglikemia terhadap berat badan dan tumbuh kembang gigi yang meliputi fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi, dan ekspresi IGF-1 yang berperan penting dalam proses tumbuh kembang gigi.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimana pengaruh hiperglikemia induk tikus bunting diabetik terhadap berat badan dan tumbuh kembang benih gigi anak tikus (postnatal hari ke-1) yang meliputi fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi, dan ekspresi IGF-1 pada IEE dan dental papila?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hiperglikemia induk tikus bunting diabetik terhadap berat badan dan tumbuh kembang benih gigi anak tikus (postnatal hari ke-1) yang meliputi fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi, dan ekspresi IGF-1 pada IEE dan dental papila.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Bagi Peneliti**

Meningkatkan pengetahuan tentang pengaruh hiperglikemia pada masa kehamilan terhadap proses tumbuh kembang gigi postnatal pada anak.

### **1.4.2 Bagi Masyarakat**

Memberikan informasi kepada masyarakat tentang pengaruh hiperglikemia pada masa kehamilan terhadap proses tumbuh kembang gigi postnatal pada anak.

### **1.4.3 Bagi Institusi**

Menjadi referensi ilmiah yang dapat digunakan untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diabetes Mellitus (DM)

#### 2.1.1 Definisi dan Prevalensi

*World Health Organization* (WHO) 2016 menyatakan bahwa diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit kelainan metabolik dengan karakteristik kenaikan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) kronis serta kelainan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya. Penurunan sekresi insulin pada DM tipe 1 atau *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM) disebabkan karena kerusakan sel  $\beta$  pankreas akibat dari reaksi autoimun, sedangkan penurunan sekresi insulin pada DM tipe 2 atau *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM) disebabkan karena berkurangnya fungsi sel  $\beta$  yang progresif akibat glukotoksisitas, lipotoksisitas, tumpukan amiloid dan faktor lain yang disebabkan oleh resistensi insulin disamping faktor usia dan genetik (Soegondo, 2015).

Data epidemiologi terkini menunjukkan jumlah penderita diabetes diseluruh dunia saat ini mencapai 200 juta dan diperkirakan akan meningkat lebih dari 330 juta pada tahun 2025. Alasan peningkatan ini termasuk meningkatnya angka harapan hidup dan pertumbuhan populasi yang tinggi dua kali lipat disertai peningkatan angka obesitas yang dikaitkan dengan urbanisasi dan ketergantungan terhadap makanan olahan (Utz *et al.*, 2016). Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007 dan 2013 melakukan wawancara untuk menghitung proporsi DM usia 15 tahun ke atas. Orang yang pernah didiagnosa oleh dokter sebagai kencing manis atau dalam 1 bulan terakhir mengalami gejala sering haus, sering lapar, sering kencing dengan jumlah banyak, dan mengalami penurunan berat badan didefinisikan sebagai DM. Hasil wawancara tersebut mendapatkan bahwa proporsi DM pada Riskesdas 2013 meningkat hampir 2 kali lipat dibandingkan tahun 2007 (Kemenkes RI, 2014).

Jumlah penderita DM diperkirakan akan terus meningkat jumlahnya dengan adanya kenaikan prevalensi diabetes yang terus menerus meningkat dari tahun ketahun.

Hal ini disebabkan karena adanya peningkatan kemakmuran suatu populasi. Dalam kurun waktu 1 atau 2 dekade yang akan datang diperkirakan penderita diabetes khususnya DM tipe 2 akan meningkat drastis yang disebabkan oleh beberapa faktor, seperti faktor keturunan, obesitas, gaya hidup, demografi, serta karena berkurangnya penyakit infeksi dan kurang gizi (Soegondo, 2015).

### 2.1.2 Patomekanisme Diabetes Mellitus

Berbagai komplikasi dapat diakibatkan oleh hiperglikemia yang terjadi akibat diabetes melitus. Komplikasi DM biasanya menyerang organ dan jaringan yang memiliki banyak pembuluh kapiler, seperti ginjal, retina, dan jaringan saraf. Komplikasi yang luas dari pada diabetes sangat dipengaruhi oleh konsentrasi kadar glukosa darah, sehingga peningkatan kadar glukosa darah menjadi penyebab utama kerusakan jaringan pada diabetes. Hal ini disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia dalam merubah kondisi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas. Hiperglikemia dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan radikal bebas yang merupakan awal dari kerusakan oksidatif dan dikenal dengan stres oksidatif (Ullah *et al.*, 2015).

Kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita diabetes dapat memicu terjadinya proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs (*advanced glycation end-product*). AGEs diproduksi melalui reaksi maillard yang ditandai dengan adanya asam amino teralkilasi, residu fluoresens, dan ikatan silang (*cross linkage*) intramolekul maupun intermolekul. AGEs memegang peran yang cukup signifikan dalam proses terjadinya berbagai komplikasi pada diabetes, baik AGEs yang berada di jaringan (intraseluler) maupun di sirkulasi plasma darah

(ekstraseluler). Interaksi antara AGEs dalam sirkulasi dengan RAGE (*receptor for advanced glycation end product*) akan meningkatkan produksi ROS (*reactive oxygen species*) intraseluler dan meningkatkan faktor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) dan produknya, yakni *endothelin-1*, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *E-selectin*, *tissue factor*, *thrombomodulin*, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), sitokin proinflamasi IL(interleukin)-1 $\alpha$ , IL-6, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), dan RAGE (Al-Farabi, 2013).

Keadaan hiperglikemia akan meningkatkan metabolisme glukosa melalui jalur sorbitol. Sebagian besar glukosa intraseluler dimetabolisme melalui proses fosforilasi dan proses glikolisis, tetapi pada keadaan hiperglikemia diabetik sebagian glukosa akan diubah menjadi sorbitol oleh enzim aldose reduktase. Sorbitol intraseluler yang terbentuk akan meningkatkan osmolaritas intraseluler, bersifat sebagai oksidan reaktif, dan mengakibatkan disfungsi sel. Hiperglikemia diduga dapat meningkatkan pembentukan diasilgliserol yang selanjutnya mengaktifkan protein kinase C (PKC). Diasilgliserol menimbulkan perubahan pada tingkat molekuler berupa gangguan pada proses transkripsi gen yang berfungsi untuk sintesis fibronektin, kalogen tipe IV, protein kontraktil, dan protein matriks ekstraseluler di sel endotel dan neuron. Hiperglikemia juga akan mengaktifkan jalur heksosamin yang diperantarai enzim fruktosa 6 fosfat, yang merupakan substrat glikosilasi dan pembentukan proteoglikan (Methebula, 2015; Lei *et al.* 2013).

Jalur heksosamin mengubah fungsi glikosilasi enzim seperti *endothelial nitric oxide syntase* dan mengganggu ekspresi gen untuk *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1). Faktor pertumbuhan memegang peranan penting dalam terjadinya komplikasi diabetes dan pada penderita DM produksinya meningkat. Saat ini telah dibuktikan terdapatnya hubungan peningkatan beberapa faktor pertumbuhan dengan terjadinya komplikasi DM, seperti *platelet derived growth factor*, *epidermal growth factor*, *growth hormone* dan *fibroblast growth factor*. Semua faktor pertumbuhan tersebut terbentuk melalui 4 teori terjadinya

komplikasi DM yaitu jalur AGEs, sorbitol, diasilgliserol, dan heksosamin (Decroli, 2008)

Pada keadaan hiperglikemia akan terjadi peningkatan GH dan akan terjadi penurunan kadar IGF-1 dalam sirkulasi. Turunnya kadar IGF-1 pada keadaan hiperglikemia diabetik ini disebabkan karena adanya gangguan pada hormon insulin yang menyebabkan sensitivitas sel hepatosit pada hepar terhadap GH menurun dan menyebabkan sekresi IGF-1 dalam darah juga akan menurun, sehingga pada keadaan hiperglikemia akan terjadi peningkatan GH dan penurunan IGF-1 dalam sistem sirkulasi yang dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan, karena IGF-1 memiliki peran penting dalam menjaga keberlangsungan hidup sel, sintesis protein, proliferasi sel, dan mencegah kematian sel (Yakar dan Adamo, 2012).

### 2.1.3 Diabetes Mellitus pada Masa Kehamilan (Gestational)

Diabetes yang terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes disebut dengan diabetes gestational. Meskipun diabetes ini dapat membaik setelah persalinan, sekitar 50% wanita yang mengidap diabetes tipe ini tidak akan kembali ke kondisi normal setelah kehamilan berakhir. Bahkan jika membaik setelah persalinan risiko untuk mengalami diabetes tipe 2 setelah sekitar 5 tahun mendatang lebih besar dari normal. Ibu yang pernah mengalami diabetes gestational memiliki risiko yang lebih besar untuk mengalami diabetes gestational lagi pada kehamilan yang selanjutnya. kebutuhan insulin pada ibu hamil akan meningkat pada pertengahan hingga akhir kehamilan, tetapi pada ibu hamil dengan gestational diabetes memiliki penurunan respon insulin yang disebabkan karena gangguan pada sel  $\beta$  pankreas sehingga mengakibatkan hiperglikemia (Utz *et al.*, 2016).

Diabetes gestational sering dikaitkan dengan kelebihan berat badan dan obesitas, telah diketahui bahwa kelebihan berat badan dan obesitas meningkatkan risiko terjadinya diabetes gestational pada ibu hamil. Obesitas dapat menyebabkan inflamasi tingkat rendah yang akan meningkatkan asam xanthurenic yang merupakan faktor penyebab diabetes tipe 2, prediabetes, dan diabetes gestational (Law dan Zang,

2017). Adanya antigen fetus pada ibu hamil juga diduga dapat menyebabkan diabetes gestational. *Human Leukocyte Antigen-G* (HLA-G) pada plasenta akan menghambat respon sel T sitotoksik pada antigen trophoblas fetus yang juga memiliki fungsi protektif pada sel islet pankreas (Shobeiri *et al.*, 2008).

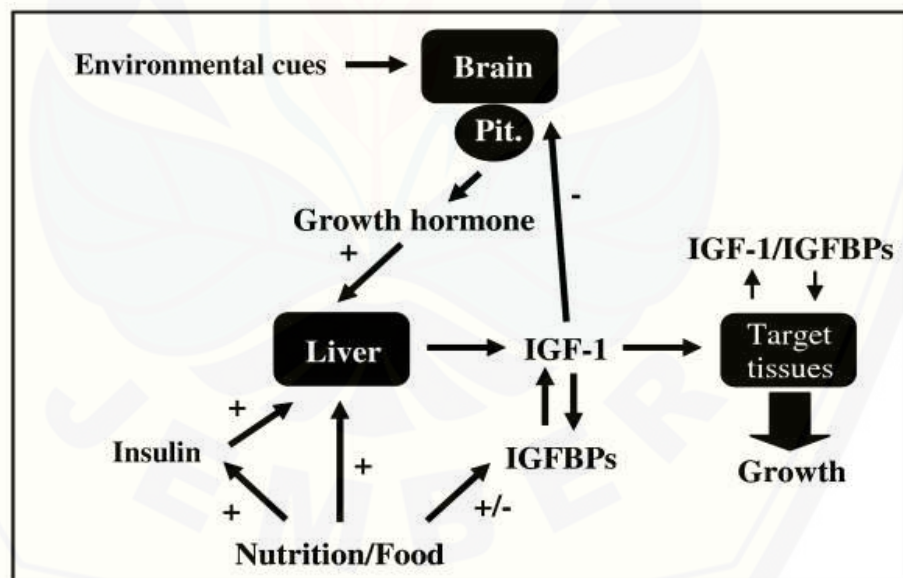
#### 2.1.4 Efek Hiperglikemia pada Masa Kehamilan

Diabetes pada kehamilan dapat menimbulkan efek negatif pada kehamilan dengan meningkatkan risiko malformasi kongenital, lahir mati dan bayi bertubuh besar pada masa kehamilan, yang dapat menyebabkan masalah dalam persalinan. Anak yang dilahirkan dari ibu dengan diabetes gestational juga memiliki risiko yang lebih besar untuk mengalami obesitas dan DM tipe 2 (Morisson, *et al.*, 2017). Diabetes melitus pada kehamilan juga diketahui dapat memiliki pengaruh yang buruk terhadap pembentukan gigi berupa berkurangnya ketebalan gigi (hypoplasia) dan berkurangnya aposisi serta pembentukan mineral pada dentin (Abbassy *et al.*, 2015).

Ibu hamil dengan gestational diabetes melitus memiliki gangguan fungsi insulin yang akan mengakibatkan hiperglikemia. Hiperglikemia pada ibu hamil dapat menyebabkan peningkatan glukosa darah pada fetus, karena aliran darah ibu akan masuk kedalam aliran darah fetus melalui sawar plasenta. Peningkatan glukosa darah pada fetus akan mengakibatkan pematangan sel  $\beta$  pankreas menjadi lebih cepat, sehingga akan mengakibatkan peningkatan produksi dan sekresi insulin (hiperinsulinemia) pada fetus. Tingginya kadar glukosa darah dan hiperinsulinemia pada fetus mengakibatkan peningkatan pembentukan lemak pada fetus yang menyebabkan fetus menjadi bertubuh besar (*macrosomia*) dan akan menyusahkan persalinan (Kc *et al.*, 2015).

## 2.2 *Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1)*

*Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)* merupakan polipeptida rantai tunggal yang memiliki peran penting pada proses pertumbuhan, perkembangan dan metabolisme. IGF-1 memiliki struktur molekul yang mirip dengan insulin, tetapi memiliki peran metabolik yang berbeda dengan insulin. IGF-1 berperan sebagai autokrin/parakrin dan endokrin yang akan disekresikan ke sistem sirkulasi dan jaringan sekitarnya. Hepar merupakan organ utama yang mensekresikan IGF-1 dalam tubuh, hepatosit mensekresikan 75% dari total IGF-1 dalam sistem sirkulasi. *Growth Hormone (GH)* merupakan hormon yang disekresikan oleh kelenjar pituitary dan berperan dalam regulasi sekresi IGF-1, begitu juga IGF-1 meregulasi produksi GH pada kelenjar pituitary melalui mekanisme *negative feedback* (Gambar 2.1). Jumlah sekresi IGF-1 sangat dipengaruhi oleh nutrisi, insulin, usia, aktifitas fisik, dan stres (Yakar dan Adamo, 2012).

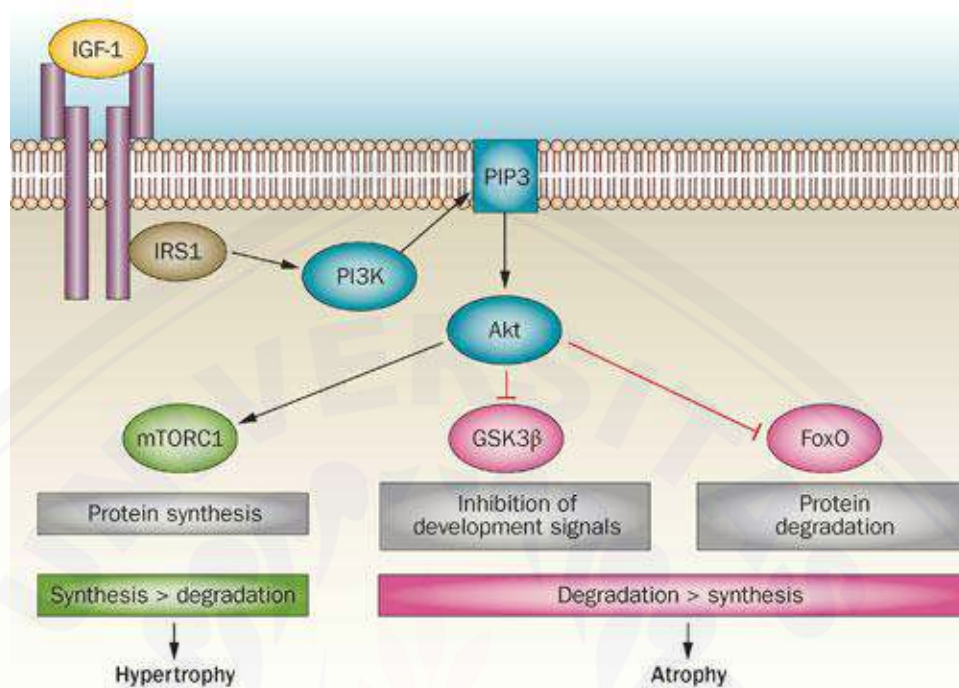


Gambar 2.1 Pengaturan sekresi IGF-1 pada sistem sirkulasi sebagai endokrin (Cote *et al.*, 2007)



Aktifitas seluler dari IGF-1 diperantarai oleh IGF reseptor tipe 1 (IGF-1R) yang memberikan sinyal mitogenik kepada sel dan dapat mencegah kematian sel. Bioaktivitas dari IGF-1 diatur oleh *Insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP) yang mengatur stabilitas jumlah IGF-1 dalam darah dan ekstraseluler matriks. IGFBP mengatur aktifitas IGF-1 dengan cara memicu maupun menghambat perlekatan IGF-1 pada IGF-1R. Perlekatan IGF-1 pada IGF-1R memicu fosforilasi tirosin dari bagian interseluler dari  $\beta$ -subunit (Lewwit, 2017). Fosforilasi dari tirosin memberikan tempat untuk perlekatan dari beberapa substrat, termasuk *insulin receptor substrate* (IRS) yang memicu fosforilasi berlanjut. IRS mengaktifkan p85 subunit dari *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3-K) yang mengakibatkan peningkatan ikatan membran *phospholipid phosphatidyl inositol -3, 4, 5-triphosphate* dan menambahkan *phosphoinositide-dependent kinase-1* dan protein kinase B atau yang biasa disebut dengan Akt pada membran (Finlay dan Cantrell, 2010).

Akt akan mengaktifasi *mamalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) yang berperan pada pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel dengan meningkatkan serapan nutrisi, penyimpanan energi dan translasi protein. Aktivasi mTORC1 sering dikaitkan dengan kemampuan IGF-1 untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel, proliferasi sel, hipertropi dan migrasi sel (Finlay dan Cantrell, 2010). Akt juga mengaktifasi protein *forkhead transcription factors* (FOXO) yang meningkatkan siklus sel, apoptosis, stres oksidatif dan aktivasi enzim glukoneogenik. Akt juga akan menghambat *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) yang berfungsi untuk membentuk glikogen, GSK3 juga dipercaya berperan dalam efek anti apoptosis dan hipertrofi yang diinduksi oleh IGF-1 (Guntur dan Rosen, 2013). Rangkaian Aktifitas bioseluler IGF-1 untuk melakukan metabolisme glukosa, meningkatkan pertumbuhan, sintesa protein, proliferasi sel, dan mencegah kematian sel dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Aktivitas bioseluler IGF-1 untuk melakukan metabolisme glukosa, meningkatkan pertumbuhan, sintesa protein, proliferasi sel dan mencegah kematian sel. (Hanaoka *et al.*, 2012)

IGF-1 memiliki peran yang sangat penting pada proses pertumbuhan dan perkembangan, sehingga gangguan pada kadar IGF-1 dalam darah dapat menyebabkan gangguan pada pertumbuhan dan perkembangan. Kadar IGF-1 dalam darah yang berkurang dapat menyebabkan gangguan metabolik berupa gangguan pertumbuhan pada tulang dan sintesa protein. Gangguan metabolik berupa turunnya sensitivitas insulin dapat disebabkan karena kurangnya kadar IGF-1 dalam darah yang menyebabkan peningkatan *growth hormone* (GH). Peningkatan GH dapat menyebabkan turunnya sensitivitas sel terhadap insulin yang menyebabkan sel mengalami kekurangan nutrisi (Wu, *et al.*, 2009). Kurangnya IGF-1 dapat menyebabkan hilangnya gigi M3 pada 90% pasien, 30% gigi lainnya mengalami hipodontia, dan memiliki prevalensi gigi berjejal yang lebih sedikit karena lebar mesio distal gigi yang berkurang. IGF-1 memiliki peran penting dalam aktivitas bioseluler dari hormon pertumbuhan (GH), diketahui bahwa kekurangan hormon pertumbuhan

dapat memiliki dampak yang buruk bagi pertumbuhan dan perkembangan gigi. Kurangnya hormon pertumbuhan dapat menyebabkan terlambatnya erupsi gigi dan akar gigi yang dihasilkan akan menjadi lebih pendek, sehingga mudah gigi akan menjadi lebih mudah tanggal. Hormon pertumbuhan yang berkurang juga dapat menyebabkan kelainan pada pembentukan matriks jaringan keras gigi, sehingga dapat menyebabkan amelogenesis imperfekta. Pada kasus yang langka hormon pertumbuhan bahkan dapat menyebabkan agenisi pada gigi (Atreja *et al.*, 2012; Litsas, 2015)

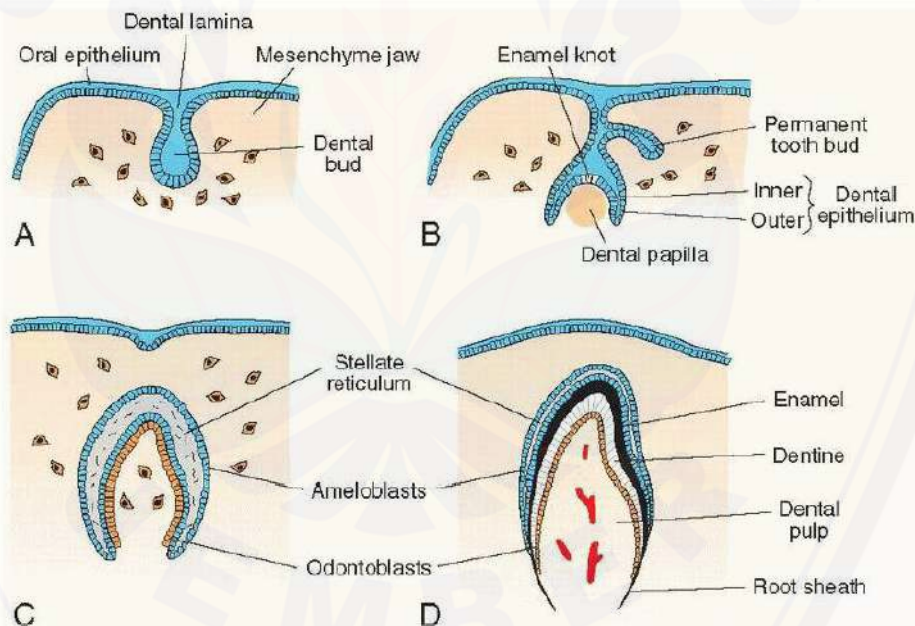
### 2.3 Pertumbuhan dan Perkembangan Gigi

Gigi berasal dari dua lapisan benih primer, yaitu ektoderm dan mesoderm yang dipengaruhi oleh *neural crest*. Enamel gigi berasal dari jaringan ektoderm rongga mulut, sedangkan dentin, sementum dan pulpa berasal dari mesoderm dan *neural crest*. Pembentukan gigi terjadi melalui empat tahapan, yaitu tahap inisiasi, proliferasi, histodiferensiasi, morfodiferensiasi, aposisi dan kalsifikasi (Wangidjaja, 2014).

Tahap Inisiasi (*bud stage*) merupakan penebalan jaringan ektoderm yang didahului oleh suatu gejala dasar induktif (Gambar 2.3 A). Pada beberapa tempat dibawah ridge rahang terjadi pembiakan dari sel-sel epitel jaringan mukosa rongga mulut ke dalam jaringan mesodermal yang terlihat sebagai suatu bentuk kuntum. Apabila terjadi gangguan pada tahap inisiasi maka akan mengakibatkan kelainan jumlah gigi seperti anodontia dan hiperodontia (Wangidjaja, 2014).

Tahap proliferasi (*cap stage*) ditandai dengan lamina gigi yang meluas sampai ke dasar jaringan mesenkim dan membentuk primordia dari gigi primer (Gambar 2.3 B). Lapisan sel mesenkim yang berada pada lapisan dalam akan mengalami proliferasi dan memadat membentuk dental papila yang kemudian membentuk dentin dan pulpa. Jaringan mesenkim yang berada disekitar organ gigi dan dental papila menjadi padat dan fibrous yang disebut dengan *dental sac* yang akan menjadi jaringan pendukung gigi. Apabila terjadi gangguan pada tahap proliferasi maka akan terjadi gangguan jumlah gigi seperti anodontia dan hiperodontia (Shresta *et al.*, 2015).

Tahap Histodiferensiasi (*bell stage*) Pada tahap ini lapisan luar organ enamel membentuk *outer enamel epithelium* (OEE), suatu lapisan sel epitel kuboid (Gambar 2.3 C). Stellate retikulum terdiri dari sel-sel stellate yang tersusun dalam matriks cairan dan merupakan bagian tengah dari organ enamel. *Inner enamel epithelium* (IEE) merupakan lapisan dalam organ enamel dan merupakan batas papila gigi yang akan berdiferensiasi menjadi ameloblas yang akan membentuk enamel. Ameloblas mensekresi matriks protein dari amelogenin dan enamelin yang nantinya tereliminasi menjadi *enamel rod* atau prisma enamel ketika keduanya terretraksi dari dentin. Apabila terjadi gangguan pada tahap histodiferensiasi maka akan menyebabkan kelainan struktur gigi, seperti dentinogenesis imperfekta dan amelogenesis imperfekta (Weiskircher *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Pertumbuhan dan perkembangan gigi (odontogenesis). (A) Tahap Inisiasi (*bud stage*), (B) Tahap Proliferasi (*cap stage*), (C) Tahap Morfodiferensiasi dan Histodiferensiasi (*bell stage*), (D) Tahap Aposisi dan Kalsifikasi. (Langman, 2016)

Tahap morfodiferensiasi merupakan tahap pembentukan gigi yang akan menentukan bentuk dan ukuran gigi. Morfodiferensiasi tidak mungkin terjadi tanpa proliferasi. *Bell stage* yang berlanjut merupakan tanda tidak hanya histodiferensiasi yang aktif tetapi juga suatu tahap penting morfodiferensiasi dari mahkota gigi dan membentuk *dentino enamel junction*. Dalam penyelesaian pada pola ini ameloblas, odontoblas dan sementoblas mengendapkan email, dentin, dan sementum serta memberikan bentuk dan ukuran yang khas untuk setiap gigi. Apabila terjadi gangguan pada tahap morfodiferensiasi maka akan terjadi gangguan bentuk dan ukuran gigi seperti gigi yang memiliki bentuk seperti pahat (*peg shape*), *gigi hutchinson*, *mulbery molar*, makrodonsia dan mikrodonsia (Wangidjaja, 2014).

Pada tahap aposisi terjadi pengendapan matriks dari struktur jaringan keras gigi (Gambar 2.3 D). Aposisi dari email dan dentin adalah pengendapan yang berlapis-lapis dari matriks ekstraseluler dan ditandai oleh adanya pengendapan yang teratur dan berirama dari bahan ekstraseluler. Pada tahap kalsifikasi terjadi pengendapan garam-garam kalsium anorganik selama pengendapan matriks. Apabila terjadi gangguan pada tahap aposisi maka akan menyebabkan perubahan struktur jaringan keras gigi misalnya hipoplasia email dan gigi yg berwarna kecoklatan karena tetrasiklin, sedangkan apabila terjadi gangguan pada tahap kalsifikasi maka butir kalsium di dalam dentin dan enamel tidak menyatu dan tertinggal sebagai butir kalsium dasar yang terpisah didalam daerah matriks eosinofilik tersendiri yang terkalsifikasi (Wangidjaja, 2014).

## 2.4 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

### 2.4.1 Siklus Reproduksi Tikus Putih

Tikus putih merupakan hewan yang sering digunakan untuk keperluan penelitian karena mempunyai siklus reproduksi yang pendek dan dapat berkembang biak dengan cepat. Tikus putih merupakan mamalia yang subur, berukuran kecil, pemeliharaannya mudah dan tidak membutuhkan biaya yang besar (Allen *et al.*, 2017). Tikus putih merupakan hewan yang cepat dewasa, dalam waktu 2-3 bulan tikus putih sudah matang secara seksual dan siap untuk dikawinkan dan tidak memperlihatkan perkawinan musiman (Sengupta, 2013).

Siklus reproduksi tikus putih sangat cepat, tikus putih matang secara seksual dan dapat kawin pada umur 8-10 minggu. Masa bunting tikus putih berlangsung selama 20-22 hari dan dapat melahirkan dalam jumlah yang banyak. Tikus putih merupakan hewan yang bersifat poliestrus, dimana estrus terjadi lebih dari 2 kali dalam setahun dan berulang secara periodik tanpa banyak variasi. Siklus estrus tikus putih terjadi 4-5 hari dan segera kembali sesudah beranak. Tikus putih memiliki estrus post partum 48 jam setelah melahirkan, tapi tikus tidak dikawinkan agar anak tikus yang dilahirkan tidak terlantar (Allen *et al.*, 2017).

Pada saat setelah fertilisasi, maka akan terjadi pembelahan sel zigot yang akan berubah menjadi morula, blastula, dan gastrula. Blastosis (blastula dan gastrula) merupakan bentuk awal embrio yang terdiri dari kelompok sel dalam (*inner cell mass*) yang akan berkembang menjadi embrio, lapisan trophoblast dan gastrosul. Lapisan trophoblast akan berkembang menjadi selaput ekstra embrionik yang akan berfungsi sebagai alat untuk kelangsungan hidup dan melindungi perkembangan embrio (Martin, 2013).

Tabel 2.1 Data Biologi Umum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

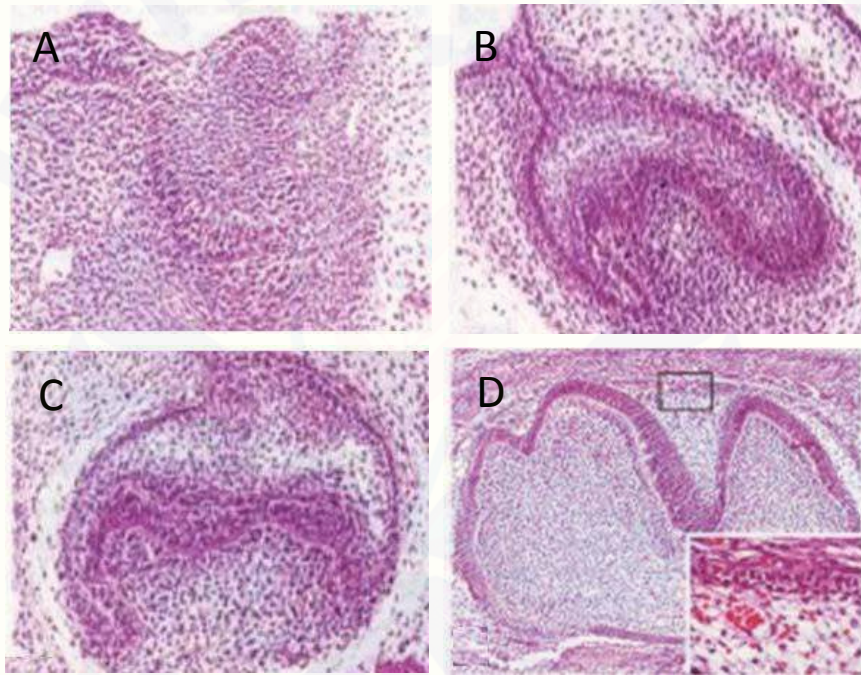
Parameter	Keterangan
Lama Bunting	20-22 hari
Kawin sesudah beranak	1-24 jam
Umur disapih	21 hari
Umur dikawinkan / pubertas	8-10 minggu
Siklus Kelamin	Poliestrus
Siklus Estrus	4-5 hari
Lama Estrus	9-20 jam
Ovulasi	8-11 jam setelah muncul estrus, spontan
Perkawinan	Pada waktu estrus
Fertilisasi	7-10 jam
Berat lahir	5-6 gram
Berat dewasa	Jantan : 300-400 gram Betina : 250-300 gram
Jumlah anak	Rata-rata 9 ekor
Plasenta	Diskoidal, hemokorial
Uterus	2 kornua, bermuara sebelum serviks
Perkawinan Kelompok	3 betina, 1 jantan

Sumber : Smith dan Mangkoewidjojo, 1988

Pada saat belum terjadi implantasi zigot mendapatkan sumber makanan dari sekresi kelenjar-kelenjar uterus yang berupa cairan uterin, sesudah implantasi terjadi zigot memperoleh makanan dari saluran induk. Pada hewan politokus implantasi tiap-tiap embrio dalam uterus diatur oleh suatu mekanisme kontraksi myometriium hingga tidak terjadi penimbunan embrio pada suatu tempat, melainkan penyebaran keseluruhan permukaan endometriium (Martin, 2013).

#### 2.4.2 Tumbuh Kembang Gigi Tikus Putih

Gigi pada tikus putih berjumlah sebanyak 16 gigi yang terdiri dari, 2 gigi insisivus atas, 2 gigi insisivus bawah, 6 gigi molar atas dan 6 gigi molar bawah. Gigi pada tikus memiliki kesamaan dengan gigi manusia dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Gigi tikus berkembang melalui interaksi yang berkelanjutan antara *dental epithelium* dan *neural crest*. Pembentukan gigi tikus dimulai dari fase inisiasi, (bud stage), fase proliferas (*cap stage*), fase morfodiferensiasi, histodiferensiasi (bell stage), tahap aposisi dan kalsifikasi (Santiago, *et al.*, 2013).



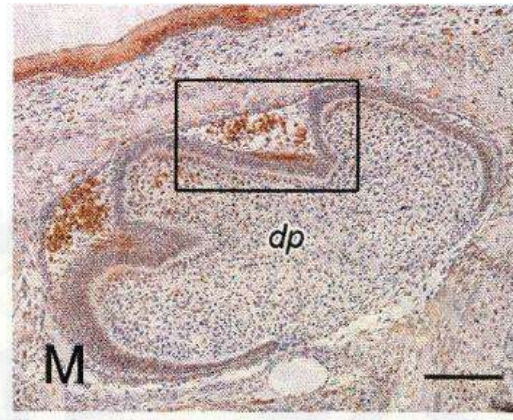
Gambar 2.4 Gambaran histologis benih gigi molar1 rahang bawah kanan tikus (A) pada fase bud (hari ke-13,5), (B) fase cap (hari ke-14,5), (C) fase bell (hari ke-18,5) dan (D) postnatal hari ke-1. (Sumber : Glucose Uptake Mediated by Glucose Transporter 1 is Essential for early tooth Morphogenesis and Size Determination of Murine Molars; Yonemochi *et al.*, 2011).



Fase inisiasi merupakan permulaan pembentukan kuncup gigi (*bud*) dari jaringan epitel rongga mulut yang terjadi pada hari ke-13,5 intrauterin (gambar 2.4 A). Fase morfogenesis ditandai dengan terjadinya proliferasi dari sel dan perluasan dari organ enamel (*cap stage*) yang dimana pada tikus putih terjadi pada hari ke-14,5 (gambar 2.4 B), fase histo dan morfodiferensiasi (*bell stage*) terjadi spesialisasi dari sel yang mengalami perubahan histologis dalam susunannya yang terjadi pada hari ke 18,5 intrauterin (gambar 2.4 C) dan pada postnatal hari ke-1 (gambar 2.4 D) benih gigi tikus sudah memasuki fase aposisi dan kalsifikasi dimana terjadi pengendapan dan mineralisasi matriks enamel dan dentin (Singh, 2015).

## 2.5 Imunohistokimia

Metode pewarnaan jaringan dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan fungsinya, yaitu pewarnaan umum dan pewarnaan khusus, pewarnaan umum yang sering digunakan adalah hematoxilin-eosin (HE), sedangkan pewarnaan khusus yang sering digunakan salah satunya adalah imunohistokimia. Imunohistokimia merupakan metode pewarnaan jaringan yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan molekul atau berbagai macam komponen yang terdapat di dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antara antigen dan antibodi. Metode imunohistokimia menggunakan antibodi spesifik yang dilabel dengan ikatan kimia suatu zat yang dapat dilihat, tanpa label itu mempengaruhi kemampuan antibodi untuk membentuk suatu kompleks dengan antigen yang bersangkutan (Kim *et al.*, 2016).



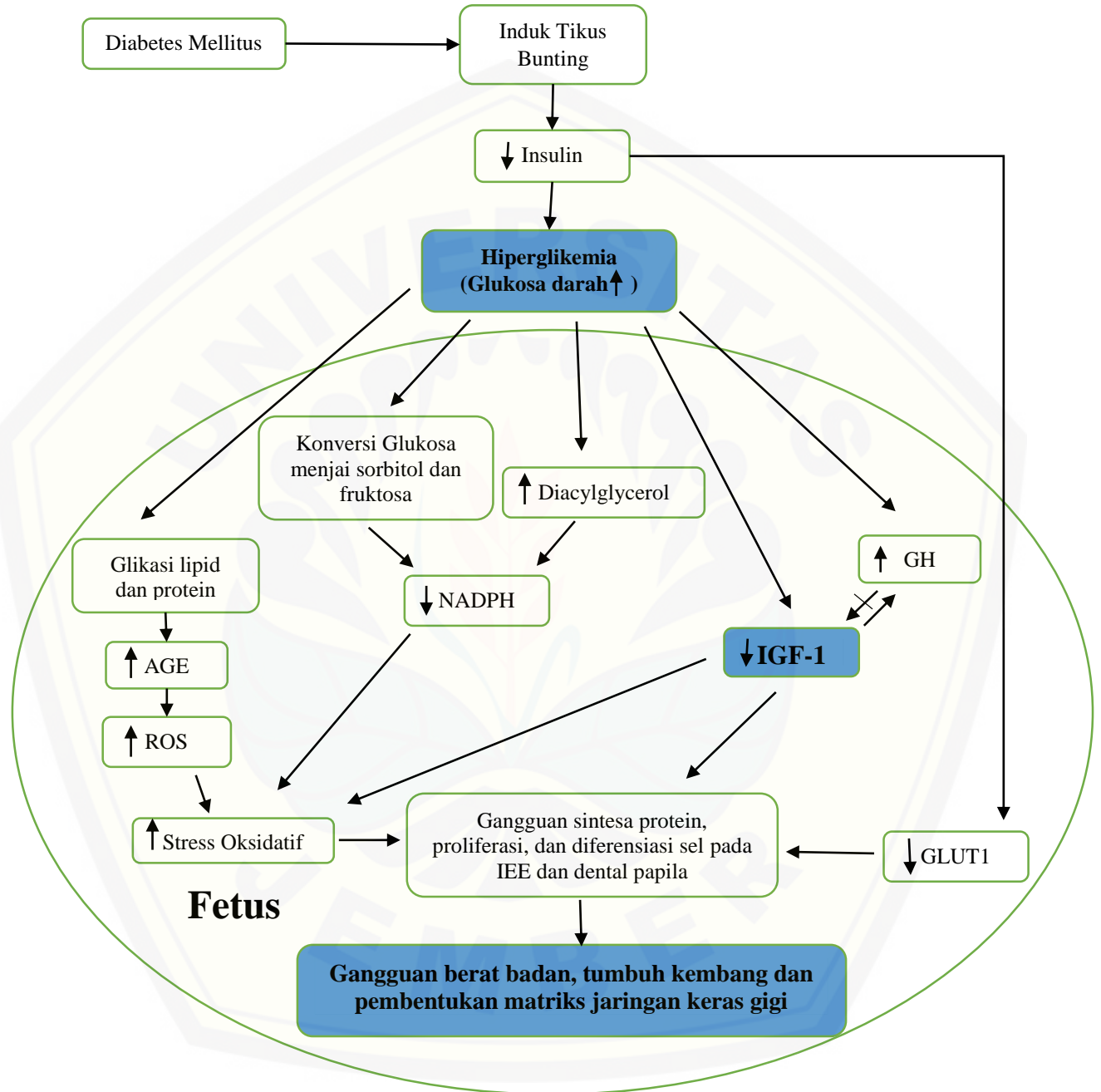
Gambar 2.5 Benih gigi molar 1 rahang bawah tikus putih dengan pewarnaan imunohistokimia reaksi positif terhadap glukosa transporter 1 (GLUT 1) pada enamel organ (tanda kotak) memberikan warna yang terpulas berwarna coklat (Yonemochi *et al.*, 2011).

Dalam pewarnaan imuno histokimia reaksi positif akan memberikan warna yang terpulas berwarna coklat pada bagian sel yang mempunyai spesifisitas dengan antibodi primer yang digunakan (Gambar 2.5). Dengan melakukan pewarnaan imunohistokimia dapat terlihat ekspresi dari IGF-1 yang terdapat pada benih gigi (Kim *et al.*, 2016).

## 2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah kondisi hiperglikemia induk tikus bunting diabetik dapat mempengaruhi berat badan dan tumbuh kembang benih gigi anak tikus (postnatal hari ke-1) yang meliputi fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi dan ekspresi IGF-1 pada IEE dan dental papila.

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka konsep penelitian

- = Variabel terikat/ yang diamati
- = Proses yang terjadi pada fetus tikus

### 2.7.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang memiliki karakteristik hiperglikemia (peningkatan kadar glukosa dalam darah) kronis yang disebabkan karena gangguan sekresi insulin, kerja insulin maupun kedua-duanya. Kondisi hiperglikemia kronis pada induk tikus bunting akan mengakibatkan glikasi lipid dan protein yang akan menghasilkan AGEs. Dalam sirkulasi AGEs akan berinteraksi dengan RAGE yang akan menyebabkan peningkatan produksi ROS. Hal ini menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan (stres oksidatif) dalam tubuh induk tikus yang mengandung janin tikus. Stres oksidatif yang meningkat pada penderita diabetes akan menyebabkan kerusakan lipid seluler, protein maupun DNA dan menghambat fungsi normal sel. Keadaan hiperglikemia juga menyebabkan peningkatan aktivasi jalur poliol yang akan mengkonversi glukosa menjadi sorbitol dan fruktosa, juga meningkatkan pembentukan diacylglycerol melalui aktivasi protein kinase C dan akan mempercepat pembentukan ROS yang berperan dalam meningkatkan stres oksidatif dengan cara menurunkan kadar NADPH.

Keadaan hiperglikemia pada induk tikus bunting akan menyebabkan peningkatan GH dan akan mengakibatkan penurunan kadar IGF-1 dan GLUT1 dalam darah. IGF1 yang menurun disebabkan karena hepar membutuhkan insulin untuk dapat menerima sinyal biologis dari GH dan mensekresikan IGF-1 kedalam darah. Menurunnya kadar GLUT1 dan IGF-1 dalam sistem sirkulasi dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan, karena IGF-1 dan GLUT-1 memiliki peran penting dalam menjaga keberlangsungan hidup sel, sintesis protein, proliferasi sel, dan mencegah kematian sel. IGF-1 juga memiliki peran untuk mengurangi stres oksidatif, sehingga penurunan kadar IGF-1 menyebabkan peningkatan stres oksidatif. Gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein akibat hiperglikemia, peningkatan stres oksidatif, dan penurunan kadar IGF-1 pada induk dan janin tikus akan mengakibatkan gangguan sintesa protein, proliferasi, dan diferensiasi pada sel-sel pembentuk gigi, sehingga hiperglikemia pada induk tikus diabetik dapat menyebabkan gangguan berat badan, tumbuh kembang dan pembentukan matriks jaringan keras gigi anak tikus.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vivo* dengan rancangan *the post test only control group design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. (Notoatmojo, 2010).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk perlakuan hewan coba, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk tahap pemrosesan jaringan, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk tahap pengecatan jaringan.

#### 3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2017 – bulan Maret 2018.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah anak tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dari induk tikus bunting.

### 3.3.2 Sampel Penelitian

Jumlah subyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 10 ekor anak tikus. Terdapat 2 kelompok perlakuan yang digunakan pada penelitian ini, dimana setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor anak tikus yang berasal dari induk tikus bunting yang berbeda dan diambil secara *simple random sampling*. Besar subyek penelitian didapat dari perhitungan rumus sebagai berikut (Daniel dan Cross, 2013).

$$n \geq \frac{Z^2 + \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n : besar sampel tiap kelompok

Z : nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $Z = 1,96$

$\sigma$  : standar deviasi subjek

d : kesalahan yang masih dapat ditoleransi

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang dapat diterima ( $\sigma$ ) sama dengan (d),

maka :  $\sigma^2 =$

$$n \geq \frac{Z^2 + \sigma^2}{d^2} \geq Z^2$$

$$n \geq (1,96)^2$$

$$n \geq 3,84 \approx 4$$

Berdasarkan rumus di atas maka jumlah sampel minimal yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan 5 sampel pada tiap kelompok untuk menghindari kegagalan pada saat perlakuan. Terdapat dua kelompok yang digunakan pada penelitian ini, sehingga jumlah keseluruhan sampel penelitian adalah 10 ekor anak tikus dari 10 ekor induk tikus yang berbeda.

### 3.3.3 Kriteria Sampel Anak Tikus

Penelitian ini menggunakan sampel anak tikus dengan kriteria :

#### a. Kriteria inklusi sampel anak tikus

Kriteria inklusi sampel pada penelitian ini adalah anak tikus yang dilahirkan dari induk tikus (post natalhari ke-1) dalam keadaan hidup

#### b. Kriteria eksklusi sampel anak tikus

Kriteria eksklusi sampel pada penelitian ini adalah anak tikus yang dilahirkan dari induk tikus (postnatal hari ke-1) dalam keadaan mati

## 3.4 Identifikasi Variabel penelitian

### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah KGD induk tikus bunting.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah berat badan dan tumbuh kembang benih gigi anak tikus (postnatal hari ke-1). Tumbuh kembang benih gigi anak tikus dilihat dari fase tumbuh kembang, pembentukan matriks jaringan keras gigi, dan ekspresi IGF-1 yang terdapat pada benih gigi M1 maksila kanan anak tikus khususnya pada IEE dan dental papila.

### 3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini adalah :

#### a. Kriteria induk tikus

Tikus wistar jenis *Rattus norvegicus*, jenis kelamin betina, berat badan 150-250 gram, umur 2-3 bulan, kondisi bunting dengan usia kehamilan perkiraan 10 hari, hiperglikemia (KGD  $\geq$  200 mg/dl), kondisi fisik baik, dan perilaku normal.

b. Pemeliharaan tikus

Masa adaptasi dan perlakuan meliputi pemberian makan standar dan minum, jenis makanan dan minuman yang diberikan, kebersihan kandang, dan pemantauan kesehatan tikus.

c. Regio pengambilan sampel jaringan

Rahang atas (maksila) kanan untuk melihat benih gigi M1

### 3.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Tikus Bunting

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina bunting perkiraan 10 hari yang mengandung anak tikus ditandai dengan perut yang membesar, kebutuhan makanan yang bertambah dan dengan melakukan pemeriksaan palpasi pada perut tikus (Paronis *et al.*, 2014).

#### 3.5.2 Tikus Diabetik

Tikus Diabetik merupakan tikus putih dengan kondisi diabetes yang dibuat dengan menginduksi *streptozotocin* dengan dosis 40 mg/kg berat badan tikus wistar betina bunting yang dilakukan secara intraperitoneal dan kemudian dilakukan pemeriksaan Kadar Glukosa Darah (KGD). Tikus wistar betina dinyatakan diabetes apabila  $KGD \geq 200$  mg/dL (Qinna dan Badwan, 2015).

#### 3.5.3 Tumbuh Kembang Benih Gigi

Pertumbuhan dan perkembangan gigi M1 maksila kanan yang dimulai dengan pembentukan dua lapisan embrionik pembentuk gigi (ektoderm dan mesoderm) pada hari ke13,5 intrauterin hingga postnatal hari ke-1 .



### 3.5.4 Pengamatan Ekspresi IGF-1

Pengamatan ekspresi IGF-1 dilakukan pada IEE dan dental papila benih gigi M1 maksila kanan anak tikus dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia dan dilakukan pada 3 lapang pandang yang berbeda. Ekspresi IGF-1 menggunakan pewarnaan imunohistokimia akan memperlihatkan sitoplasma sel yang terpulas berwarna kecoklatan. Pengamatan ekspresi IGF-1 secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan aplikasi berbasis web, yaitu aplikasi *ImmunoRatio*.

## 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1 Alat Penelitian

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makan dan minum
- c. Handscoon dan masker
- d. Neraca ohaus digital (Camry EK 3650, China)
- e. Neraca analitik digital (Pioneer, Ohaus Corp., USA)
- f. Glukometer *easy touch* (GCU, Indonesia)
- g. Lancet (GCU, Indonesia)
- h. Strip tes glukosa (GCU, Indonesia)
- i. *Disposable syringe* 1 ml (Onemed, Indonesia)
- j. *Surgical blade*
- k. Kuas, kertas saring, label identitas
- l. Pot jaringan
- m. Pipet dan mikro pipet
- n. Gelas ukur
- o. *Automatic processing tissue machine*
- p. *Tissue cassette*
- q. *Block mould*
- r. *Disposable microtome blade*
- s. *Microtome holder*

- t. *Waterbath*
- u. *Slide Warmer*
- v. *Microwave*
- w. *Deck glass*
- x. *Object glass*
- y. *Object glass poly-L-lysine coating*
- z. Wadah baskom
- aa. *Staining jar*
- ab. Mikroskop cahaya (Olympus CX21, Japan)
- ac. Kamera mikroskop optilab (Olympus CX41RF, Olympus DP 20, Japan)

### 3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Pakan standar hewan coba (Turbo, Indonesia) dan air minum
- b. *Streptozotocin* (Bioworld, USA)
- c. Larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan PH 4,5 (FMIPA UNEJ, Indonesia)
- d. Eter (Merck KgaA, Germany)
- e. Larutan *buffer* formalin 10%
- f. Asam Formiat 10%
- g. *Xylol solution* (Merck KgaA, Germany)
- h. Akuades steril (Onelab waterone, Indonesia)
- i. Ethanol 99,9 %
- j. Parrafin (Merck KgaA, Germany)
- k. Gliserin
- l. *Hematoxilin meyers*
- m. Eosin
- n. *Peroxidase block reagent*
- o. IGF-1 antibodi (BIOSSUSA)
- p. antibodi sekunder (Trekkie Universal Link)
- q. *Diaminobenzidine* (DAB) Chromogen

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Ethical Clearance

Sebelum penelitian, dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

#### 3.7.2 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dilakukan selama tiga hari, selama waktu tersebut tumbuh kembang tikus diamati. Kebutuhan makanan dan minuman tikus harus diperhatikan dengan benar dan terkontrol sehingga tidak kekurangan. Hal ini dimaksudkan agar didapat kondisi tikus yang sama dan dapat dikelompokkan sesuai kriteria.

Operator mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Selanjutnya dilakukan pemilihan induk tikus yang memenuhi kriteria. Kriteria induk tikus yang digunakan yaitu tikus wistar berkelamin betina dengan berat badan antara 150-250 gram, berumur 2-3 bulan, tikus dalam keadaan bunting dengan usia kehamilan perkiraan 10 hari, dan sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dari tikus dan apabila diangkat tikus tidak berputar.

#### 3.7.3 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba

- a. Hewan coba (induk tikus) dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu, kelompok I yang merupakan kelompok kontrol dan kelompok II yang merupakan kelompok perlakuan dan masing-masing terdiri dari 5 ekor induk tikus.
- b. Perlakuan yang diberikan yaitu :
  - 1) Kelompok I adalah kelompok tikus bunting yang tidak diinduksi *streptozotocin*.
  - 2) Kelompok II adalah kelompok tikus bunting yang diinduksi *streptozotocin* sebanyak 40 mg/dL BB secara intraperitoneal hingga KGD  $\geq$  200 mg/dL. Apabila pada hari ke-1 setelah induksi KGD dari induk tikus belum mencapai 200 mg/dL, maka induk tikus tersebut tidak digunakan

- 3) KGD induk tikus diukur menggunakan alat glukometer pada saat sebelum induksi *streptozotocin* (STZ), hari ke-1 setelah induksi STZ (saat dipastikan positif DM) dan setiap 2 hari hingga *postnatal* hari ke-1.

#### 3.7.4 Pembuatan Larutan *Streptozotocin* (STZ)

Larutan STZ dibuat dengan cara melarutkan 40 mg/kg BB STZ kedalam 50 mg/ml larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5. Larutan harus dipersiapkan kurang dari 5 menit sebelum diinjeksikan karena sifatnya yang tidak stabil (Yao *et al.*, 2014).

#### 3.7.5 Induksi *Streptozotocin* (STZ)

- a. Berat badan awal tikus ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan dosis STZ yang akan diberikan.
- b. Tikus dipuasakan selama 8 jam dan tetap diberi minum sebelum dilakukan induksi STZ.
- c. KGD awal diukur terlebih dahulu menggunakan glukometer. Dilakukan perlukaan pada ekor tikus dengan menggunakan *lancet* kemudian sampel darah diambil dari vena ekor. Setelah darah keluar, *test strip* ditempelkan di ujung ekor tikus.
- d. Larutan STZ diinjeksi sesuai dosis secara intraperitoneal.
- e. 30 menit setelah induksi, tikus diberikan larutan glukosa 10% untuk mengatasi syok hipoglikemik akibat induksi STZ (Yao *et al.*, 2014)
- f. Pada hari ke-1 paska injeksi STZ, dilakukan pengukuran KGD, sampel darah diambil seperti cara sebelumnya (poin C) dan pada *postnatal* hari ke-1.
- g. Tikus dengan KGD  $\geq 200$  mg/dL dikategorikan sebagai tikus DM.

### 3.7.6 *Euthanasia* Hewan Coba

- a. Anak tikus dieuthanasia dengan metode overdosis inhalasi eter pada hari ke 1 postnatal. Tikus dimasukkan ke dalam toples yang di dalamnya terdapat kapas yang dibasahi larutan eter dan ditutup rapat untuk beberapa saat hingga tikus mati
- b. Dilakukan pemotongan rahang atas (maksila) sebelah kanan anak tikus.

### 3.7.7 Pembuatan Preparat Jaringan

Tahap pembuatan preparat menurut (Syafriadi *et.al*, 2017) adalah sebagai berikut:

#### a. Pengambilan sampel sediaan

Melakukan pemotongan pada rahang anak tikus. Jaringan difiksasi dengan menggunakan larutan buffer formalin 10% selama minimal 12-18 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi, dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci menggunakan air mengalir.

#### b. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi dilakukan dengan memakai larutan asam formiat 10% selama 7-14 hari. Proses dekalsifikasi dinyatakan selesai, apabila pada test tusuk menggunakan jarum tidak ditemukan adanya jaringan keras.

#### c. Pemrosesan jaringan

Pemrosesan jaringan dilakukan menggunakan mesin *automatic processing tissue* dengan prosedur sebagai berikut :

##### 1). Dehidrasi

Dehidrasi adalah penarikan air dari dalam jaringan menggunakan alkohol konsentrasi rendah ke tinggi. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 x 60 menit.

## 2). Clearing

Clearing adalah proses penjernihan jaringan dengan menggunakan bahan *xylol* sebanyak 4 kali pada 4 tabung dengan waktu 1 jam untuk masing-masing tabung.

## 3). Impegnasi

Impegnasi adalah proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 60° C. Jaringan dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu paraffin 60°C sebanyak 3 kali dalam waktu 2 jam untuk tiap kali proses impegnasi.

## 4). *Embedding*

*Embedding* adalah proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu paraffin. *Mould base* (cetakan) dari bahan *stainless steel* diolesi dengan gliserin agar blok paraffin yang mengeras mudah dilepas. Cetakan diisi dengan paraffin cair kurang lebih ¼ cetakan. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam *histological basket* tanpa merubah letak *cutting surface* dengan sedikit tekanan. Paraffin cair kemudian dituangkan ke dalam cetakan sampai seluruh jaringan terendam paraffin. Paraffin dibiarkan membeku dan selanjutnya blok paraffin dilepas dari cetakan dan disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan pemotongan.

## 5). Penyayatan

Penyayatan blok paraffin dengan menggunakan *microtome*. Sebelum penyayatan jaringan, alat yang perlu dipersiapkan antara lain *object glass* dan *object glass* yang dilapisi dengan *Poly-L-lysine*. Tahapan penyayatan jaringan adalah :

- a) Penyayatan menggunakan *microtome*, sebelumnya dibersihkan terlebih dahulu pisau *microtome* dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan *xylol* dengan arah tegak lurus.
- b) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6 mikron atau sesuai kebutuhan.

- c) Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperature 38-42°C hingga sayatan mekar.
- d) Mengambil sayatan yang sudah mekar dengan *object glass* untuk dilakukan pewarnaan HE dan *object glass* yang dilapisi *poly-L-lysine* untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia.
- e) keringkan hasil sayatan yang berada di atas *object glass* menggunakan *slide warmer* dan dikeringkan dengan suhu 35-40°C minimal selama 12 jam.

### 3.7.8 Pengecatan jaringan dengan teknik Hematoksilin-Eosin (HE)

Pengecatan preparat jaringan dilakukan dengan tahapan :

- a. Deparafinisasi menggunakan larutan *xylol*, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 2-3 menit lalu diulangi dengan memasukkan kembali ke dalam wadah yang berbeda selama 2-3 menit.
- b. Rehidrasi dengan larutan alcohol 100% dan 95% selama 3 menit
- c. Preparat dibilas menggunakan air mengalir selama 10-15 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat untuk menghilangkan kelebihan alcohol
- d. Preparat diwarnai dengan *haematoxilin Mayer's* selama 15 menit
- e. Bilas kembali dengan air mengalir selama 20 menit
- f. Preparat direndam dengan larutan eosin selama 15 detik sampai 2 menit.
- g. Rehidrasi menggunakan alcohol dengan konsentrasi meningkat 95% dan 100% masing-masing 2-3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah yang berbeda.
- h. Preparat dimasukkan ke dalam larutan *xylol* tiga kali masing-masing 3 menit dengan wadah yang berbeda.
- i. *Mounting* menggunakan cairan Entelan lalu ditutup dengan *deck glass*.

### 3.7.9 Pengecatan jaringan dengan teknik Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan dengan imunohistokimia menurut (Anggraini, 2012) adalah sebagai berikut :

- a. Potong blok parafin menggunakan *microtome* dengan ketebalan 5 $\mu$ m, kemudian direkatkan pada *object glass* yang telah dilapisi dengan *poly-L-lysine*.
- b. Inkubasi dalam incubator dengan suhu 37°C selama 1 malam.
- c. Deparafinisasi dengan *xylol* sebanyak 3 kali dan masing-masing rangkaian selama 2 menit
- d. Rehidrasi dengan memasukkan slide ke dalam rangkaian etanol 100%, 90%, dan 70% dan masing-masing rangkaian dilakukan selama 2 menit.
- e. *Microwave* : atur suhu 90°C selama 4 menit, panaskan *epitop retrieval*, masukkan specimen slide, panaskan 80°C selama 2 menit, diamkan di suhu ruangan selama 40-60 menit, keringkan, batasi jaringan menggunakan *novopen* bila perlu.
- f. *Blocking reagent* : teteskan 3 tetes reagen *peroxidase block reagent* ke atas jaringan, inkubasi 5 menit, cuci slide dengan *buffer* pencuci untuk menghilangkan protein *block reagent*.
- g. Teteskan antibodi primer (IGF-1 antibodi) ke setiap slide dengan 150ul yang sudah diencerkan, masukkan slide dalam wadah yang bawahnya di beri alas *towel paper* dengan dibasahi dan di inkubasi selama 60 menit, cuci slide dengan *buffer* pencuci untuk menghilangkan antibodi primer.
- h. Teteskan DAB reagen secukupnya ke atas slide jaringan, inkubasi 5-10 menit, cuci slide dengan aquades, teteskan hematoksilin, inkubasi selama 5 menit.
- i. Cuci slide dengan aquades, keringkan slide dengan ethanol, bersihkan slide dengan *xylol*, teteskan entelan ke atas jaringan dan tutup specimen menggunakan *deck glass*.



### **3.8 Pengukuran Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus**

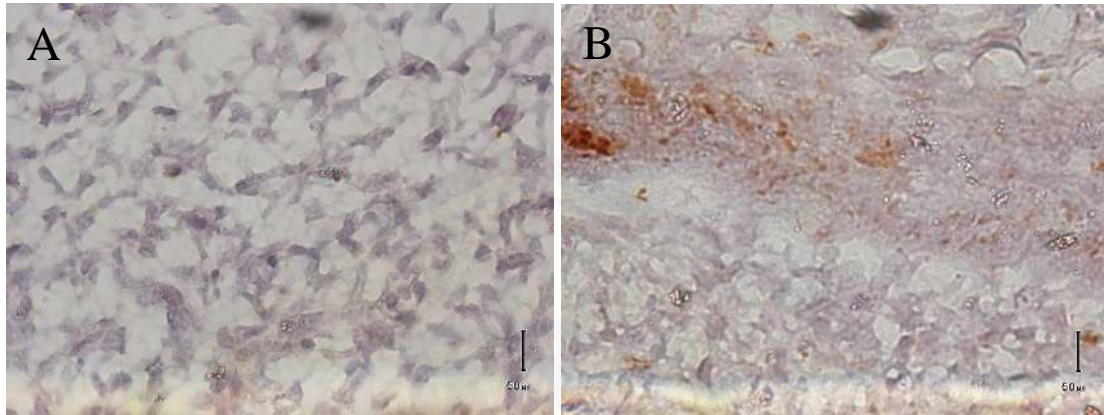
Dilakukan penimbangan berat badan anak tikus pada postnatal hari ke-1 sebelum dilakukan *euthanasia*. Pengukuran berat badan anak tikus dilakukan dengan menggunakan neraca ohaus digital. Seluruh anak tikus yang dilahirkan oleh setiap induk tikus ditimbang berat badannya untuk mendapatkan rata-rata berat badan anak tikus dari setiap induk tikus.

### **3.9 Prosedur Pengamatan Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus**

Pengamatan Histologis benih gigi M1 maksila kanan atas anak tikus dilakukan menggunakan pewarnaan HE dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. pengamatan histologis akan menunjukkan morfologi, fase tumbuh kembang dan pembentukan matriks jaringan keras pada benih gigi M1 maksila kanan anak tikus.

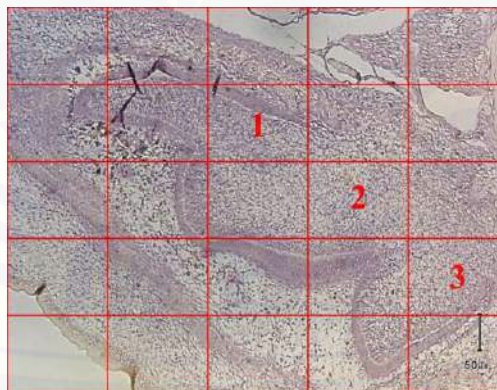
### **3.10 Prosedur Pengamatan Ekspresi IGF-1**

Pengamatan Ekspresi IGF-1 dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi primer IGF-1. Pengamatan dilakukan pada sel ameloblas *Inner Enamel Epithelium* (IEE) dan sel mesenkim dental papila. Ekspresi IGF-1 pada sel ameloblas dan sel mesenkin ditandai dengan sitoplasma sel yang akan terpulsa berwarna coklat (Gambar 3.1 B).



Gambar 3.1 (A) Gambaran HPA benih gigi M1 maksila kanan anak tikus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi IGF-1 diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x. (A) gambaran HPA dental papila menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan IGF-1. (B) gambaran HPA IEE menunjukkan sel yang mengekspresikan IGF-1 terulas berwarna coklat.

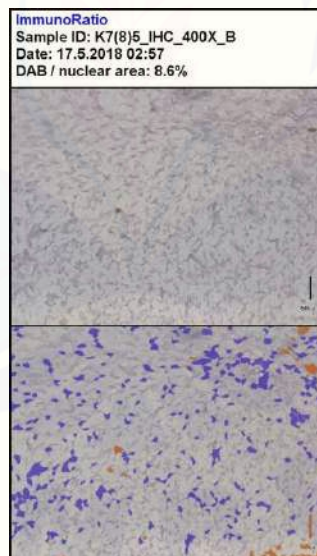
Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400X pada 3 lapang pandang yang berbeda, yaitu 1/3 distal, 1/3 tengah dan 1/3 mesial benih gigi M1 maksila kanan anak tikus (Gambar 3.2). Jumlah sel yang mengekspresikan IGF-1 dihitung persentasenya dengan menggunakan aplikasi berbasis web *ImmunoRatio* pada 3 lapang pandang kemudian diambil rata-ratanya (Yeo *et al.*, 2017)



Gambar 3.2 Benih gigi M1 maksila kanan anak tikus dengan pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan ekspresi IGF-1 dilakukan pada 1/3 distal (1), 1/3 tengah (2) dan 1/3 mesial (3). Perbesaran 100x.

Aplikasi *ImmunoRatio* merupakan aplikasi berbasis web yang akan menghitung presentasi jumlah sel yang memiliki antigen dari antibodi primer yang digunakan dengan cara memisahkan komponen pewarna (hematoksilin dan *diaminobenzidine*). Aplikasi *ImmunoRatio* akan memberikan output berupa presentase jumlah sel yang memiliki antigen spesifik dari antibodi yang digunakan dan terwarnai oleh DAB *chromogen* pada satu lapang pandang seperti yang terlihat pada (Gambar 3.3). Analisa kuantitatif pewarnaan immunohistokimia akan menjadi lebih mudah dan akurat dengan menggunakan aplikasi *ImmunoRatio* (Yeo *et al.*, 2017). presentase jumlah sel didapatkan dari hasil perhitungan dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah sel yang terwarnai oleh } \textit{diaminobenzidine}}{\text{Jumlah seluruh sel pada satu lapang pandang}} \times 100\%$$

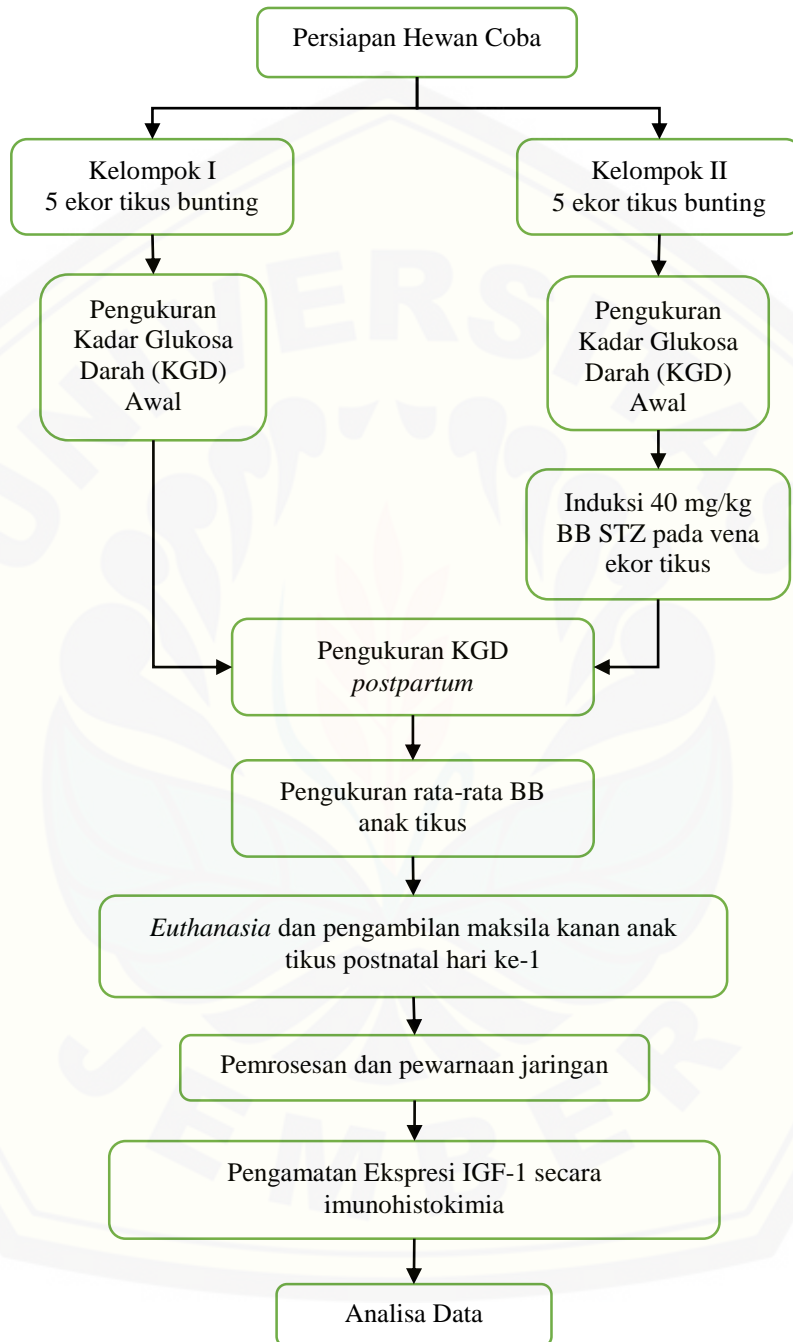


Gambar 3.3 Hasil pengamatan ekspresi IGF-1 pada dental papila secara kuantitatif dengan pewarnaan immunohistokimia menggunakan aplikasi *ImmunoRatio* menunjukkan warna semu yang dapat membedakan komponen pewarna. Warna biru menunjukkan sel yang terwarnai oleh hematoxylin dan warna coklat menunjukkan sel yang terwarnai oleh *diaminobenzidine*. Presentasi jumlah sel yang terwarnai oleh *diaminobenzidine* dan mengekspresikan IGF-1 (warna coklat) adalah 8,6%. Perbesaran 400x.

### 3.11 Analisis Data

Pada penelitian ini, hasil yang didapatkan dari pengamatan histopatologi anatomi yaitu ekspresi IGF-1 pada sel ameloblas inner enamel epithelium dan sel mesenkim dental papila dalam bentuk presentase jumlah sel yang dapat mengekspresikan IGF-1. Presentase jumlah sel yang mengekspresikan IGF-1 dihitung menggunakan software *ImmunoRatio* pada 3 lapang pandang dan diambil rata-ratanya, kemudian dilakukan analisa data menggunakan uji *Saphiro Wilk* untuk uji normalitas data, uji *Levene* untuk melihat homogenitas data dan dilanjutkan dengan uji beda nonparametrik *Mann-Whitney*, karena tidak memenuhi syarat uji parametrik.

### 3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur penelitian

## **BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa anak tikus yang dilahirkan dari induk bunting dengan hiperglikemia memiliki berat badan dan tumbuh kembang benih gigi yang terganggu. Tumbuh kembang benih gigi yang terganggu pada anak tikus yang dilahirkan dari induk bunting dengan hiperglikemia meliputi fase tumbuh kembang dan pembentukan jaringan keras gigi yang mengalami keterlambatan, begitu juga dengan ekspresi IGF-1 yang rendah pada IEE benih gigi anak tikus.

### **5.2 Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis dapat memberikan saran sebagai berikut :

- a. Perlu dilakukan metode pemeriksaan dan pewarnaan jaringan lainnya untuk mengetahui pengaruh hiperglikemia pada induk tikus bunting terhadap pertumbuhan dan perkembangan benih gigi anak tikus
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh hiperglikemia dengan terapi obat sintetis maupun herbal pada induk tikus bunting pada pertumbuhan dan perkembangan benih gigi.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abassy, M.A., Watari, I., Bakry, A.S., Hamba, H., Hasan, S.H., Tagami, J., Ono, T. 2015. *Diabetes Detrimental Effects on Enamel and Dentine Formation*. J. Dent. 43: 589-596.
- Alehagen, U., Johansson, P., Aaseth, J., Alexander, J., Brismar, K. 2017. *Increase in Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 After Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10: A Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial Among Elderly Swedish Citizen*. PLoS ONE 12(6) : e0178614
- Allen, K.P., Dwinell, M.R., Zappa, A.M., Michaels A.M., Murray, K.M., Thulin, J.D. 2016. *Rat Breeding Parameters According to Floor Space in Cage*. Journal of The American Association For Laboratory Animal Science 55(1) : 21-24
- Al-Farabi, M.J. 2013. *Antibodi Terhadap Advanced Glycation End Product, Cara Mutakhir Pencegahan Komplikasi Diabetes Melitus*. CDK-210. 40(1)
- Anggraini, R.D. 2012. *Ekspresi Imunohistokimia ki-67 pada Tumor Payudara Tikus Wistar Yang Diinokulasi Kanker Terinduksi Benzo(α)pyrene dengan Pemberian Ekstrak Benalu Teh*. Bandung: Fakultas Kedokteran USU.
- Atreja, G., Atreja, S.H., Jain, N., Sukhija, U. 2012. *Oral Manifestation in Growth Hormone Disorders*. Indian J Endocrinol Metab 16(3): 381-383
- Chen, G., Chen, J., Yan, Z., Li, Z., Yu, M., Guo, W., Tian., W. 2017. *Maternal Diabetes Modulates Dental Epithelial Ste Cell Proliferation and Self-Renewal in Offspring Through Apurinic/Apyrimidinicendonuclease 1-Mediated DNA Methylation*. Scientific Reports 7: 40762
- Chiarelli, F., Gianni, C., Mohn, A. 2004. *Growth, growth factors and diabetes* Department of Pediatrics, University of Chieti, Italy. European Journal of Endocrinology. 151 : 109–117
- Cote, G., Perry, G.M.L., Blier, P., Bernatchez, L. 2007. *The Influence of Gene-Environment Interaction on GHR and IGF-1 Expression and Their Association with Growth in Brook Charr, Salvelinus fontinalis (Mitchill)*. BMC Genetics. 8(1): 87-99.
- Daniel, W. dan Cross, C.L. 2013. *Biostatic a Foundation for Analysis in The Health Science 10<sup>th</sup> Edition*. Canada: John Wiley and Sons, Inc.

- Dewi, N., Syaifi, A., 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
- Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., Essien, U.N. 2013. *Review of The Mechanism of Cell Death Resulting From Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, Its Practical Use and Potetial Risk to Humans*. Journal of Diabetes and Metabolic Disorders :12-60.
- Fakhrudin S., Alanazi, W., dan Jackson K.E. 2017. *Diabetes Induced Reactive Oxygen Species : Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury*. Journal of Diabetes Research.
- Fedchenko, N. dan Reifenrath, J. 2014. *Different Approaches for Interpretation and Reporting of Immunohistochemistry Analysis Results in The Bone Tissue*. Diagnostic Pathology. 9: 221-232.
- Fukaya, M., Tamura, Y., Chiba, Y., Tanioka, T., Mao, J., Inoue Y., Yamada, M., Waeber, C., Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kaneki, M. *Protective Effects of Nicotinamide Derivative, Isonicotinamide, Against Streptozotocin-Induced  $\beta$  Cell Damage and Diabetes in Mice*. Biochemical and Biophysical Research Communiation 442(0): 92-98
- Giavini, E., Broccia, M.L., Prati, M., Roversi, G.D., Vismara, C. 1986. *Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on Fetal Development of The Rat*. Teratology 34(1): 81-88
- Goucalves, L.A., Boldrini, S.C., Capote, T.S.O., Binotti, C.B., Azzeredo, R.A. Martini, D.T. 2009. *Structural and Ultra-structural Features of the First Mandibular Molar of Young Rats Submitted to Pre and Post Natal Protein Deficiencies*. The Open Dentistry Journal. 3: 125-131
- Guntur, A.R. dan Rosen, C.J. 2013. *IGF-1 Regulation of Key Signaling Pathway in Bone*. BoneKEY Report 2: 437
- Hanaoka, B.Y., Peterson, C.A., Horbinski, C., Crofford, L.J. 2012. *Implication of Glucocorticoid Therapy in Idiopathic Inflammatory Myopathies*. Nature Reviews Rheumatology 8(8): 448-457.
- Kc, K., Shakya, S., Zhang, H. 2015. *Gestational Diabetes Mellitus and Macrosomia: A Literature Review*. Annals of Nutrition and Metabolism 66(2): 14-20



- Kemenkes RI. 2014. *Situasi dan Analisis Diabetes Melitus*. Infodatin Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI
- Kim, S.W., Roh, J., Park, C.S. 2016. *Immunohistochemistry for Pathologist: Protocols, Pitfalls, and Tips*. Journal of Pathology and Translational Medicine 50: 411-418
- Langman, Sadler T. W. 2016. *Embriologi Kedokteran Edisi 12*. Jakarta : EGC
- Law KP, Zhang H. 2017. *The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China*. Clin Chim Acta. 468 : 60-70
- Lei, S., Li, H., Xu, J., Liu, Y., Gao, X., Wang, J., Ng, K.F. Lau W.B., Ma, X.L., Rodrigues B., Irwin, M.G., Xia, Z. 2013. *Hyperglycemia-Induced Protein Kinase C  $\beta$ 2 Activation Induces Diastolic Cardiac Dysfunction in Diabetic Rats by Impairing Caveolin-3 Expression and Akt/eNOS Signaling*. Diabetes 62(7) : 2318-2328.
- Lewitt, M.S. 2017. *The Role of Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor System in Visceral Adiposity*. Biochemistry Insight 10
- Litsas, G. 2015. *Growth Hormone and Craniofacial Tissues. An Update*. The Open Dentistry Journal. 9:1-8.
- Martin, T.R. 2013. *Laboratory Manual for Human Anatomy and Physiology: Rat Version*. McGraw-Hill
- Matsumura, S., Salcedo, Q.A., Schiller C.M., Shin, J. S., Locke, B.M., Yakar, S., Shimizu, E. 2017. *IGF-1 Mediates EphrinB1 Activation in Regulating Tertiary Dentin Formation*. Journal of Dental Research 96(10) : 1153-1161.
- Methebula, S.D. 2015. *Polyol Pathway: A Possible Mechanism of Diabetes Complication in The Eye*. African Vision and Eye Health 74(1)
- Morisson, F.J.R., Movassaghian, M., Selly, E.W., Curran, A., Shubina, M., Egglestone, E.M., Zera, C.A., Ecker, J.L., Brown F.M., Turchin, A. 2017. *Fetal Outcomes After Diabetic Ketoacidosis During Pregnancy*. Diabetes Care 40(7) : 77-79
- Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R., de Bittencourt P.I.Jr. 2016. *Molecular Mechanism of ROS Production and Oxidative Stress in Diabetes*. The Biochemical Journal 473(24) : 4527-4550.

- Notoatmodjo, 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta
- Paronis, E., Samara, A., Polyzos, A., Spyropoulos, C., Kostomitsopoulos, N.G. 2014. *Maternal Weights as an Alternative Determinant of The Gestational Day of Wistar Rats Housed in Individually-Ventilated Cages*. *Laboratory Animals*. 49(3) : 188-195.
- Prasad, S., Sajja, R.K., Naik P., Cucullo, L. 2014. *Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview*. *Journal of pharmacovigilance* 2(2) : 125
- Polin, R.A., Abman, S.H., Rowitch, D., Benitz, W.E. 2017. *Fetal and Neonatal Physiology 5<sup>th</sup> Edition*. Elsevier: Canada
- Qinna, N.A. & Badwan A.A. 2015. *Impact Of Streptozotocin on Altering Normal Glucose Homeostasis During Insulin Testing in Diabetic Rats Compared to Normoglycemic Rats*. *Drug Des Devel* 9: 2515-2525.
- Santiago, I.M.A., Regueira, L.S., Correia P.G., de Alcantara, R.J.B., Neto, J.E., Evencio, L.B. 2013. *Morphological Aspect of Dentin-Pulp Complex Development in The Offspring of Rats Treated with Fluoxetine During Pregnancy*. *Brazilian Journal of Oral Science* 12(1)
- Sengupta, P. 2013. *The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's*. *International Journal of Preventive Medicine* 4(6): 624-630.
- Shrestha, A., Marla, V., Shrestha, S., Maharjan, I.K. 2015. *Developmental Anomalies Affecting The Morphology of Teeth-A Review*. *RSBO* 12(1) : 68-78
- Shobeiri, S.S., Abediankenaari, S., Aghae, B.L., Rahmani, Z., Gorji, B.E. 2016. *Evaluation of Soluble Human Leukocyte Antigen-G in Pheripheral Blood of Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus*. *Caspian Journal of Internal Medicine* 7(3) : 178-182
- Singh, G. 2015. *Textbook of Orthodontics 3<sup>rd</sup> Edition*. New Delhi: Jaypee
- Smith, J.B. & Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis..* Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Soldado, I.L. & Herrera, E. 2003. *Different Diabetogenic Response to Moderate Doses of Streptozotocin in Pregnant Rats, and Its Long-Term Consequences in the Offspring*. *Experimental Diab Res*. 4: 107-118
- Soegondo, S. 2015. *Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*. Jakarta : FKUI

- Syafriadi M, Pratama, S.M., Yusuf, P.R., Az-Zahrah, F. 2017. *The Effectivity of Thymoquinone Extract of Black Seeds to Blood Glucose Level and Post Extraction Healing in Diabetic Induced Rats*. FORKINAS VI FKG UNEJ 14<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup>
- Ullah, A., Khan, A., Khan, I. 2016. *Diabetes Mellitus and Oxidative Stress-A Concise Review*. Saudi Pharmaceutical Journal 24(5): 547-553
- Utz, B., Delamou A., Belaid, L., Borouwere, V.D. 2016. *Detection and Management of Diabetes During Pregnancy in Low Resource Settings: Insight Into Past and Present Clinical Practices*. Journal of Diabetes Research
- Van A.F., Holemans, K., & Aerts, L. 2001. *Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy*. British Medical Bulletin, 60, 173-182.
- Wang, S., Mu, J., Fan, Z., Yu, Y., Yan, M., Lei, G., Tang, C., Wang, Z., Zheng, Y., Yu, J., Zheng, G. 2012. *Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla*. Elsevier Stem Cell Research 8(3) : 346-356.
- Wangidjaja, Itjiningsih. 2014. *Anatomi Gigi Edisi 2*. Jakarta : EGC
- Weiskircher, M.A., Gonzales, S.M., Palazzolo, M.J. 2016. *Diagnosing Developmental Tooth Anomalies*. The Journal of Multidisciplinary Care
- World Health Organisation. 2016. *Global Report on Diabetes*. World Health Organisation. Geneva-Switzerland.
- Wulan, K.I.G.A., Hidayati, A.N., Sukanto, H. 2016. *Profil Kadar Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Serum pada Pasien Akne Vulgaris*. Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology 28(2)
- Yakar, S. and Adamo, M.L. 2012. *Insulin-Like Growth Factor-1 Physiology: Lessons from Mouse Models*. Endocrinology and metabolism clinics of North America
- Yao, X.L., Wang, J., Zhang, W.F., Wang, X.L., Liu, H.R. 2014. *Cardiac Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus Rats Induced by High Sucrose and High Fat diet and STZ Treated*. Chinese Journal of Applied Physiology 30(2):137-140

- Yeo, M.K., Kim, H.E., Kim, S.H., Chae, B.J., Song, B.J., Lee, A. 2017. *Clinical Usefulness of The Free Web-Based Image Analysis Application ImmunoRatio for Assesment of Ki-67 Labelling Index in Breast Cancer*. Journal of Clinical Pathology 70(8): 715-719
- Young, W.G. 1995. *Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 in Odontogenesis*. Int. J. Dev. 39: 263-272
- Yonemochi H.I., Nakatomi M., Harada H., Takata H., Baba O., & Ohshima H. 2011. *Glucose Uptake Mediated by Glucose Transporter 1 is Essential for early tooth Morphogenesis and Size Determination of Murine Molars*. Elsevier Developmental Biology 363: 52-61.
- Yonemochi, H.I., Otsu, K., Ohshima, H., Harada, H. 2016. *The Glycogen Metabolism Via Akt Signaling is Important for the Secretion of Enamel Matrix in Tooth Development*. Mechanism of Development 139: 18-30.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Surat Keterangan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER  
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH  
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

**ETHIC COMMITTEE APPROVAL**  
No. 041/UN25.8/KEPK/DI/2018

Title of research protocol : "Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik"  
Document approved : Research Protocol  
Principal investigator : Muhammad Nadhir Alkaff  
Member of research : -  
Responsible Physician : Muhammad Nadhir Alkaff  
Date of approval : February 5<sup>th</sup>, 2018  
Place of research : 1. Physiology Laboratory Biomedical Sect. Faculty of Dentistry Universitas Jember  
2. Anatomical Pathology Laboratory Biomedical Sect. Faculty of Dentistry Universitas Jember  
3. Biochemical Laboratory Medicine Faculty University of Brawijaya  
4. Radiology Installation RSGM Faculty of Dentistry Universitas Jember

The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.



Jember, February 10<sup>th</sup>, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember  
  
(Prof. Dr. H. M. M. P. Kes, Sp. Pros)


Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember  
  
(Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)

**LAMPIRAN B. Surat Ijin Penelitian****B.1 Ijin Laboratorium Fisiologi Bagian Biomedik FKG UNEJ**

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331)333536, Faks. 331991	
Nomor	: 0599/UN25.8.II/2018	<b>12 FEB 2018</b>
Perihal	: Ijin Penelitian	
<p>Kepada Yth Kepala Bagian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Di Jember</p>		
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :</p>		
1	Nama	: Muhammad Nadhir Alkaff
2	NIM	: 141610101064
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jln. Nias No. 7 Jember
6	Judul Penelitian	: Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Neraca Ohaus, Kandang Hewan Coba
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
11	Dosen Pembimbing	: 1. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc, Ph.D 2. drg. Dwi Merry C R, M.Kes
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
		<p>an, Dekan an, Dekan I,  Drg. IDA Susilawati, M.Kes NIP.196109031986022001</p>

## B.2 Ijin Laboratorium Patologi Anatomi Bagian Biomedik FKG UNEJ


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS JEMBER  
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

---

Nomor : OS/UN25.8.TL/2018  
 Perihal : Ijin Penelitian



12 FEB 2018

Kepada Yth  
 Kepala Bagian Laboratorium Biomedik  
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
 Di  
 Jember


Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1	Nama	: Muhammad Nadhir Alkaff
2	NIM	: 141610101064
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jln. Nias No. 7 Jember
6	Judul Penelitian	: Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Asam Formiat 10%, Xylol, Alkohol, Microtome
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
11	Dosen Pembimbing	: 1. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc, Ph.D 2. drg. Dwi Merry C R, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an, Dekan  
 Wakil Dekan I,  
  
  
 Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes  
 NIP. 196109031986022001

## B.3 Ijin Laboratorium Biokimia FK UB


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS JEMBER  
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎ (0331) 333536, Faks. 331991

---

Nomor : ~~055~~UN25.8.TL/2018  
 Perihal : Ijin Penelitian

12 FEB 2018


Kepada Yth  
 Kepala Laboratorium Biokimia  
 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya  
 Di  
 Malang

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1	Nama	: Muhammad Nadhir Alkaff
2	NIM	: 141610101064
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jln. Nias No. 7 Jember
6	Judul Penelitian	: Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
8	Data/alat yang dipinjam	: Antibodi Amelogenin, Kolagen XVII kit
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Pengaruh Hiperglikemia Terhadap Proses Tumbuh Kembang Gigi Anak Tikus Dari Induk Bunting Yang Diinduksi Diabetik
11	Dosen Pembimbing	: 1. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc, Ph.D 2. drg. Dwi Merry C R, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan  
 Wakil Dekan I,

 Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes  
 NID. 06109031986022001



**LAMPIRAN C. Perhitungan Dosis Streptozotocin (STZ)**

Dosis *Streptozotocin* yang digunakan untuk memberikan perlakuan hiperglikemia adalah sebesar 40 mg/kg BB yang dilarutkan kedalam 50 mg/ml larutan buffer asam sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 (Abdelmeguid et al., 2010). Penelitian ini menggunakan hewan coba dengan berat badan 150-250 gr.

Berat badan hewan coba = 150-250 gr = 0,15-0,25 kg

$$\begin{aligned}\text{Perhitungan} &= (\text{Dosis} \times \text{Berat}) : \text{Konsentrasi} \\ &= (40 \text{ mg/kg} \times 0,15 \text{ kg}) : 50 \text{ mg/ml} ; (40 \text{ mg/kg} \times 0,25 \text{ kg}) : 50 \text{ mg/ml} \\ &= 0,12 \text{ ml} ; 0,2 \text{ ml}\end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan larutan STZ yang digunakan adalah sebesar 0,12-0,2 ml

**LAMPIRAN D. Alat dan Bahan Penelitian**

**D.1 Alat Penelitian**



Tempat/Kandang  
Hewan Coba



Neraca Ohaus Digital



Neraca Analitik Digital  
Pa214



Syringe



Object Glass



Mould Base



Automatic Processing  
Tissue (Sakura)



Pot Jaringan



Tissue Casette



*Slide Warmer*



*Pisau Microtome*



*Waterbath*



*Microtome*



*Staining Jar*



*Deck Glass*



*Glucometer dan Lancet*



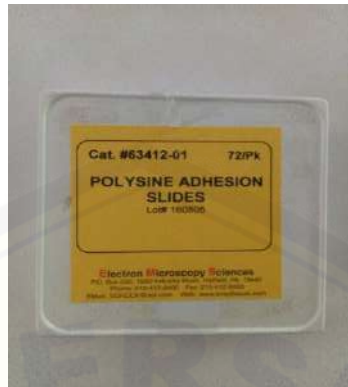
*Strip Tes Glukosa*



*Surgical Blade*



Pipet dan Mikropipet



*Object Glass Poly-L-lysine Coating*



Gelas Ukur



Mikroskop Optilab

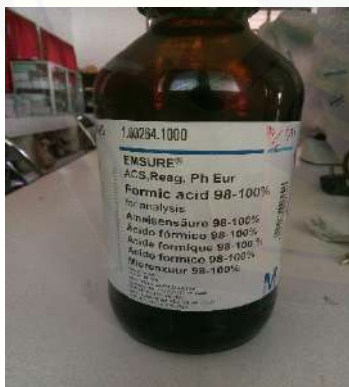


Mikroskop Cahaya



Kompur Listrik

## D.2 Bahan Penelitian



Asam Formiat 10%



Buffer Formalin 10%



*Streptozotocin*  
(bioWORLD)



Eter



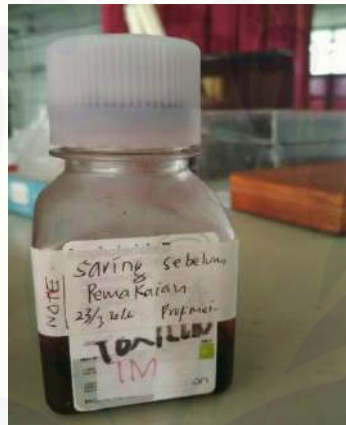
Antibodi Primer IGF-1



Ethanol



Parafin



Haematoxylin



Eosin



Buffer Asam Sitrat



Xylol



Aquades Steril

## LAMPIRAN E. Prosedur Penelitian

### E.1 Persiapan Hewan Coba



Gambar E.1 Pengelompokkan dan adaptasi hewan coba

### E.2 Pemeriksaan KGD



Gambar E.2 Pengukuran KGD dengan glukometer, perlukaan dilakukan pada vena ekor induk tikus.

### E.3 Perlakuan Hewan Coba



Gambar E.3 Induksi STZ pada induk tikus kelompok perlakuan dilakukan secara intraperitoneal

### E.4 Pengukuran Berat Badan Anak Tikus



Gambar E.4 Pengukuran berat badan anak tikus dengan menggunakan neaca ohaus digital

E.5 *Euthanasia* Hewan Coba



Gambar E.5 *Euthanasia* anak tikus dengan metode overdosis inhalasi eter

E.6 Pemotongan dan Pemrosesan Jaringan



Gambar E.6 Pemrosesan jaringan dengan menggunakan mesin *automatic processing tissue* dan pemotongan jaringan menggunakan *microtome*

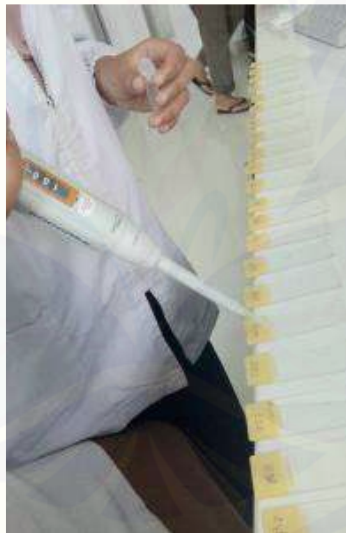


E.7 Pewarnaan Jaringan Menggunakan Pewarnaan HE



Gambar E.7 Pewarnaan jaringan menggunakan pewarnaan HE

E.8 Pewarnaan Jaringan Menggunakan Pewarnaan Imunohistokimia



Gambar E.8 Pewarnaan jaringan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi IGF-1

**LAMPIRAN F. Perhitungan Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus****F.1 Berat Badan Anak Tikus Kelompok Kontrol (gr)**

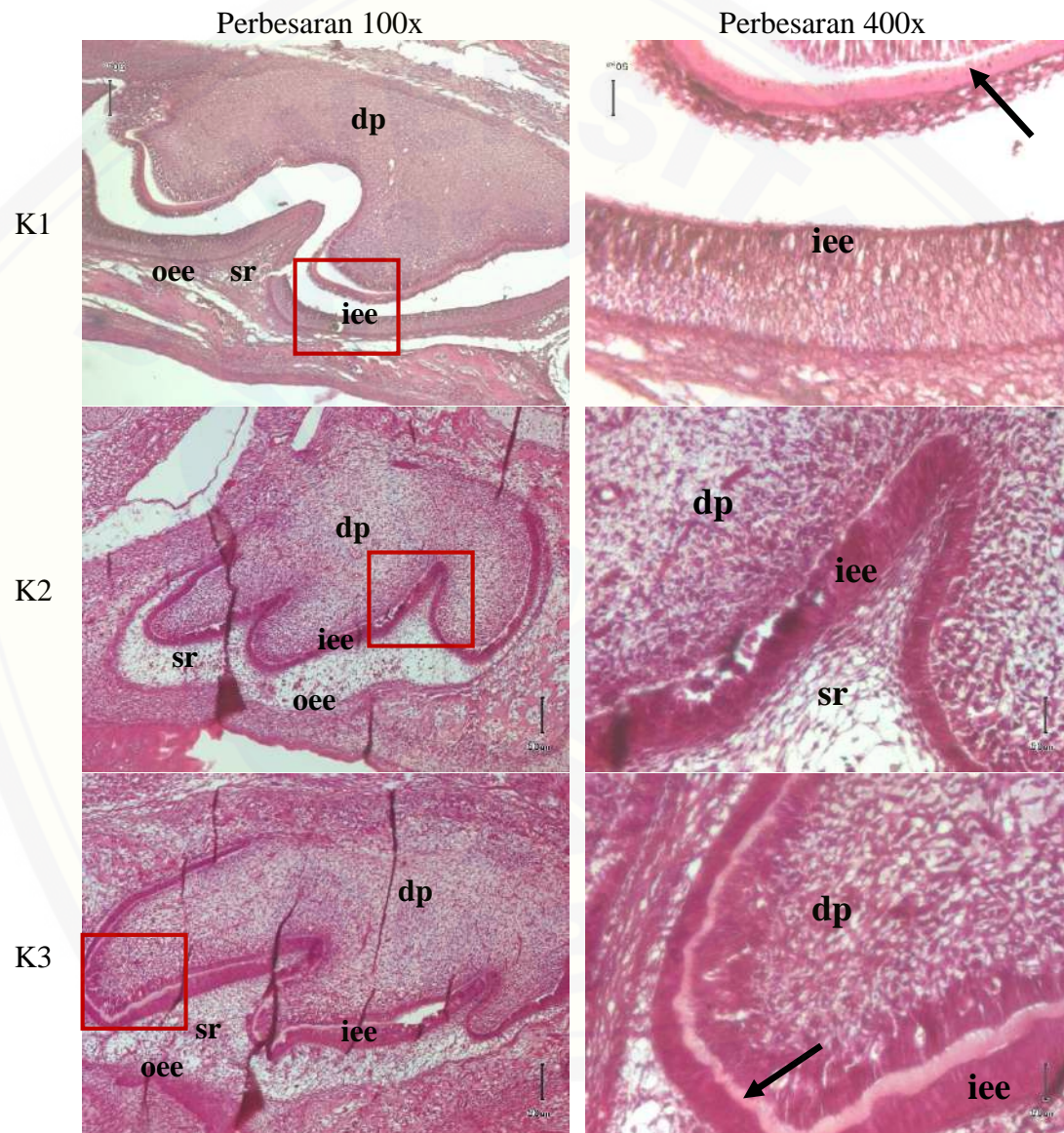
Anak Tikus	K1	K2	K3	K4	K5
1	7	6	6	6	7
2	7	7	5	6	7
3	6	7	6	6	7
4	6	7	6	7	7
5	-	6	6	6	7
6	-	7	-	-	7
7	-	6	-	-	-
8	-	7	-	-	-
9	-	7	-	-	-
10	-	7	-	-	-
$\bar{X}$	6,5	6,7	5,8	6,2	7

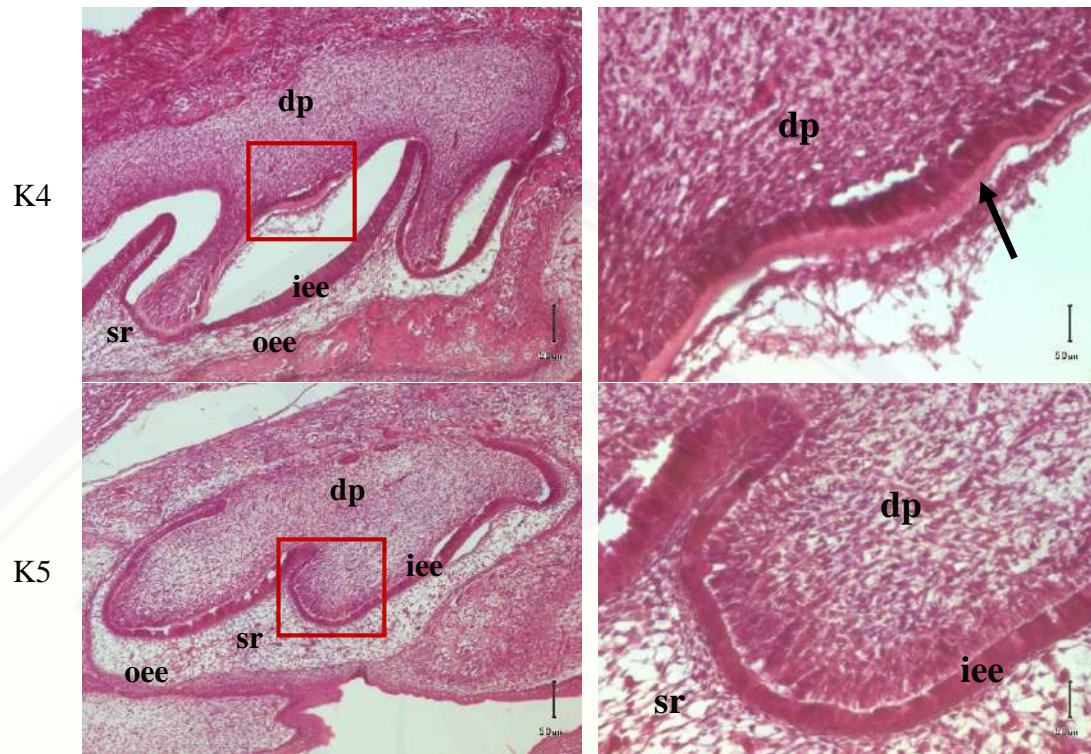
**F.2 Berat Badan Anak Tikus Kelompok Perlakuan (gr)**

Anak Tikus	P1	P2	P3	P4	P5
1	4	5	4	6	5
2	5	4	4	5	5
3	4	5	5	5	5
4	5	5	4	6	6
5	4	4	5	6	-
6	-	5	5	5	-
7	-	5	4	5	-
8	-	5	5	-	-
9	-	5	-	-	-
10	-	5	-	-	-
$\bar{X}$	4,2	4,8	5,5	5,4	5,2

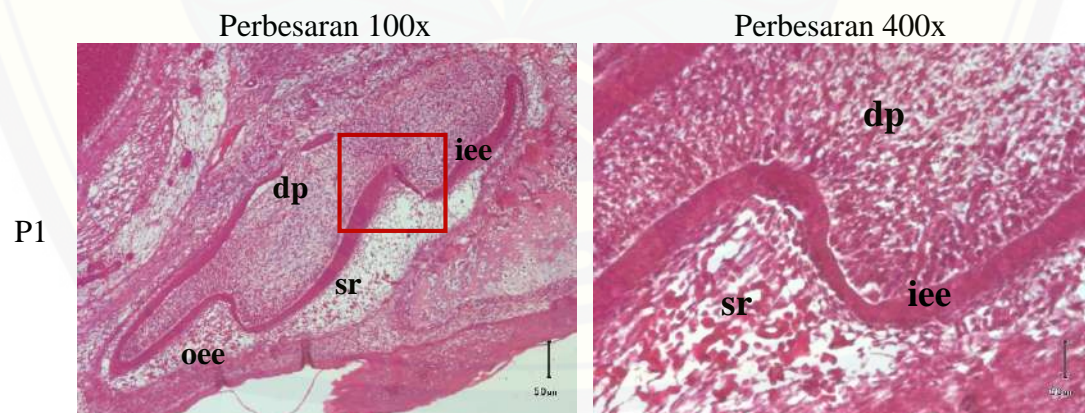
**LAMPIRAN G. Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Anak Tikus dengan Pewarnaan HE**

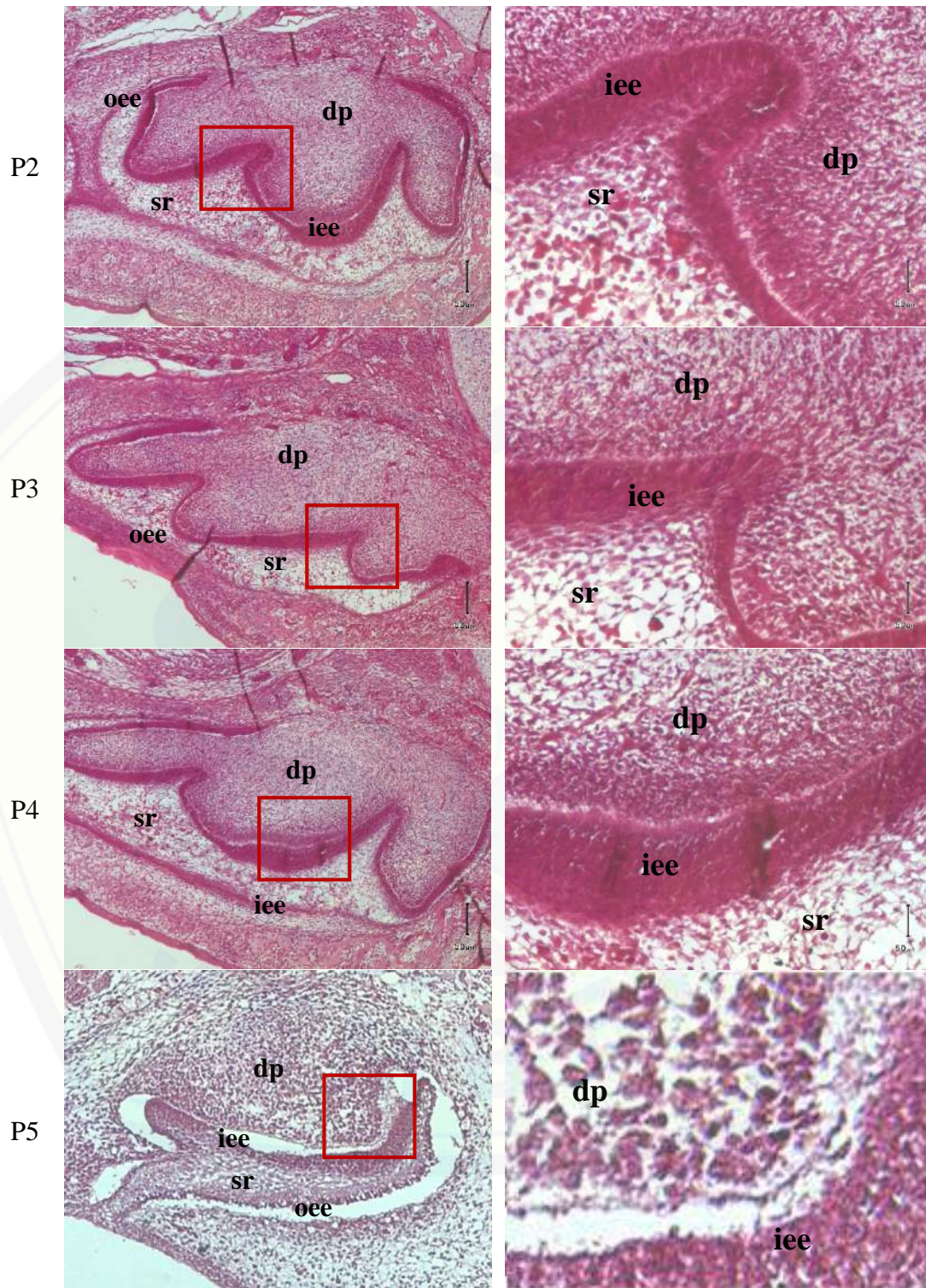
**G.1 Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Anak Tikus Kelompok Kontrol dengan Pewarnaan HE**





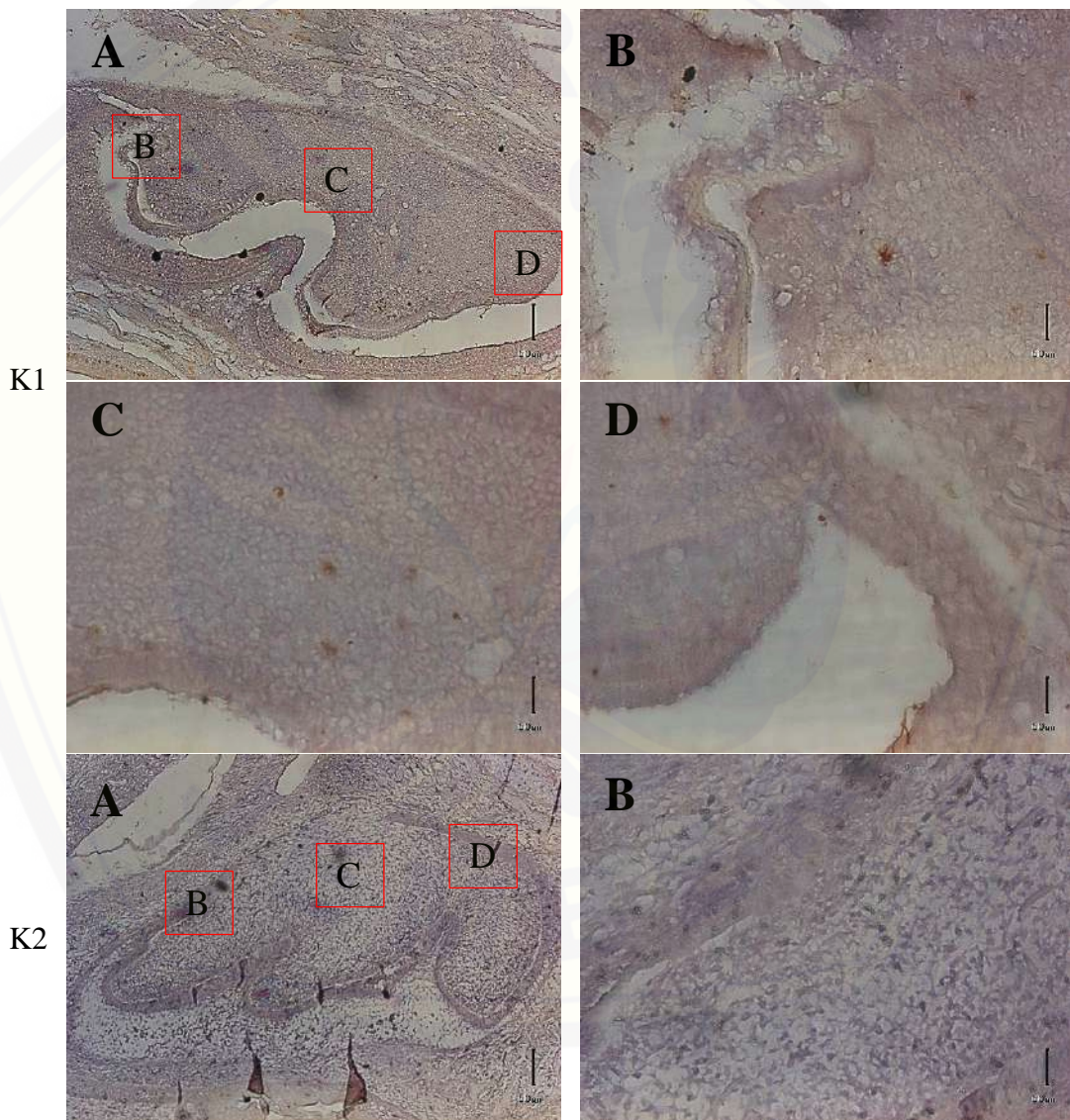
G.2 Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Anak Tikus Kelompok Perlakuan dengan Pewarnaan HE

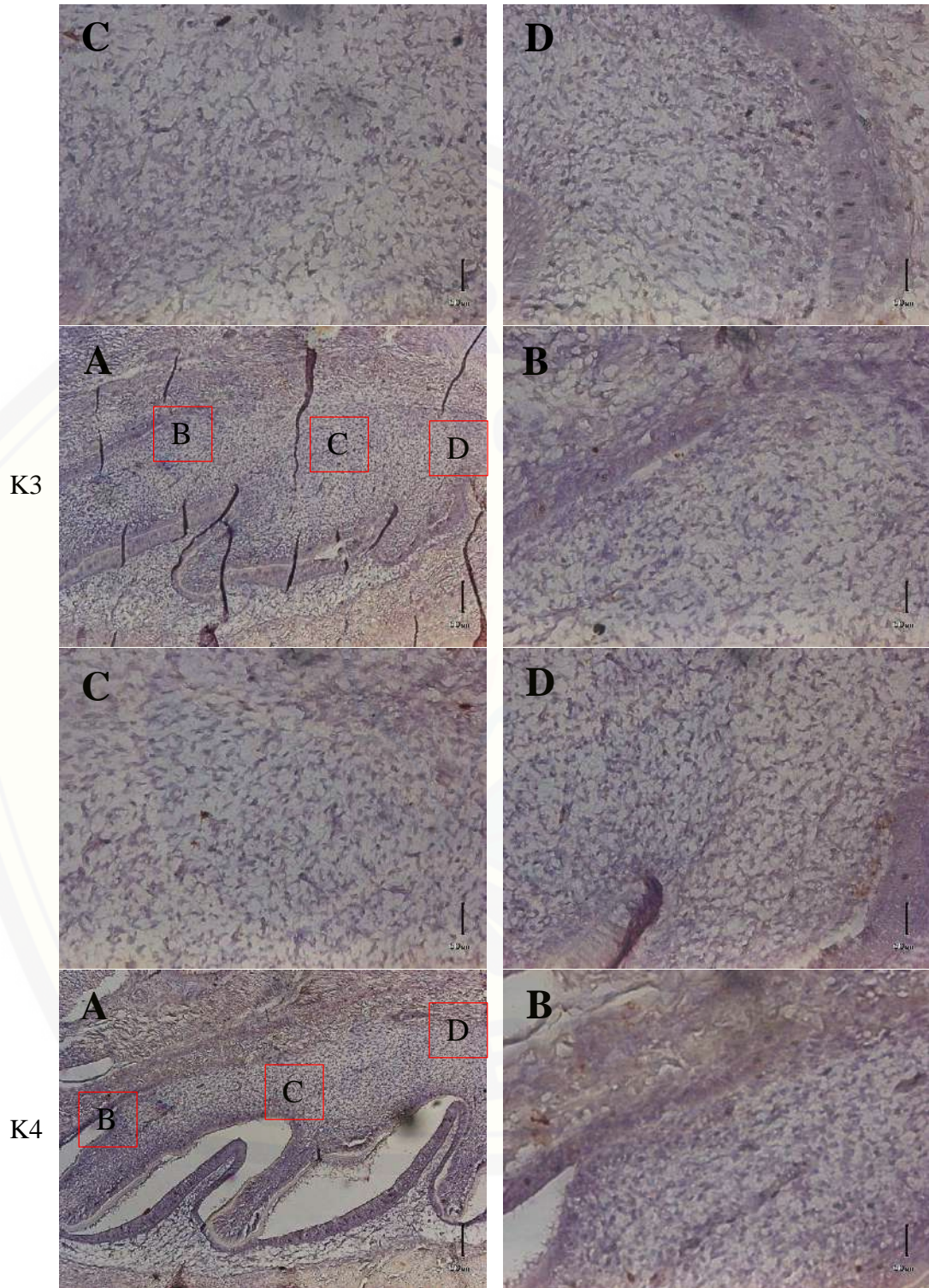


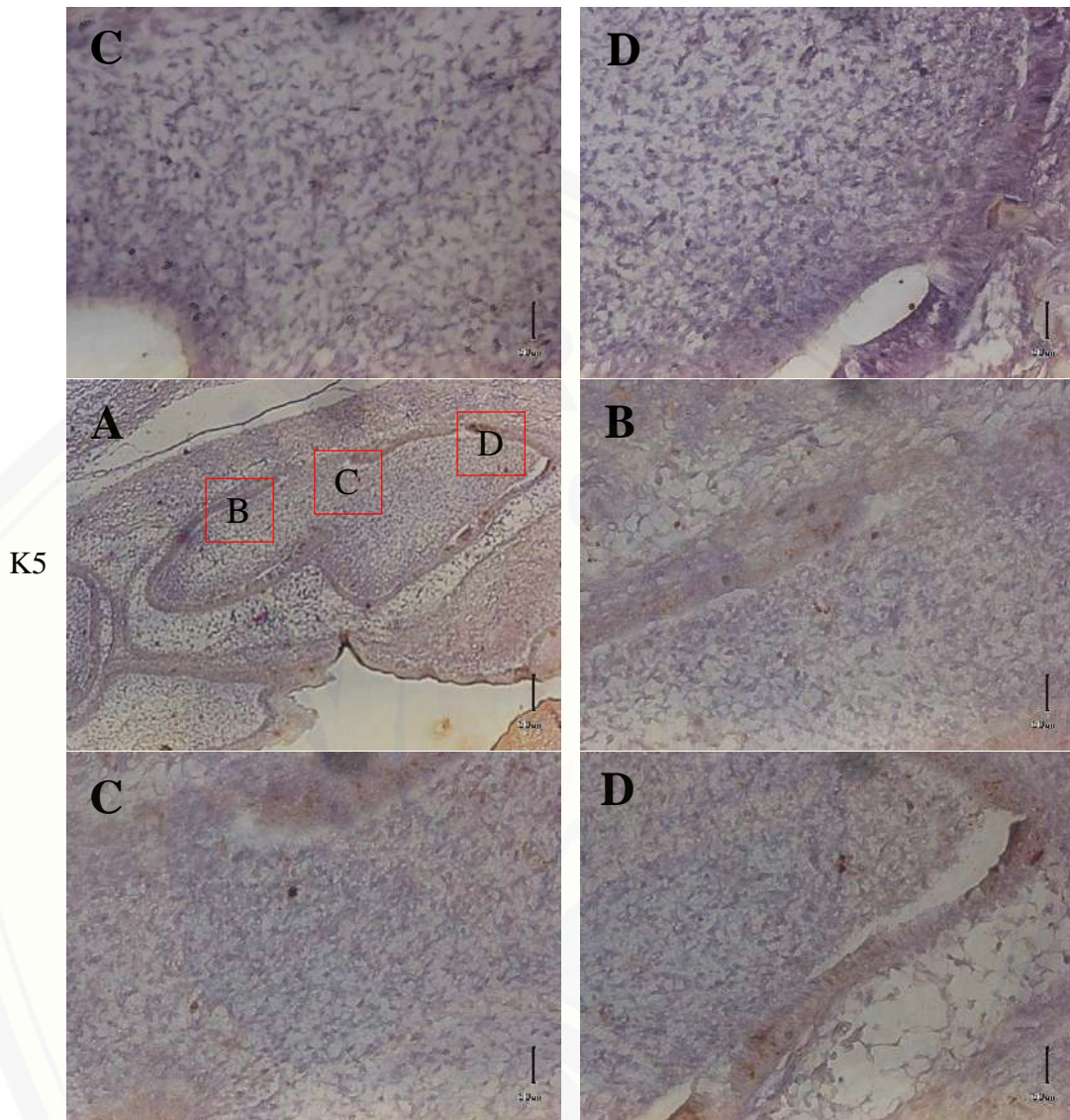


**LAMPIRAN H. Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus dengan Pewarnaan Imunohistokimia Menggunakan Antibodi IGF-1**

H.1 Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus Kelompok Kontrol dengan Pewarnaan IHC Menggunakan Antibodi IGF-1







Keterangan:

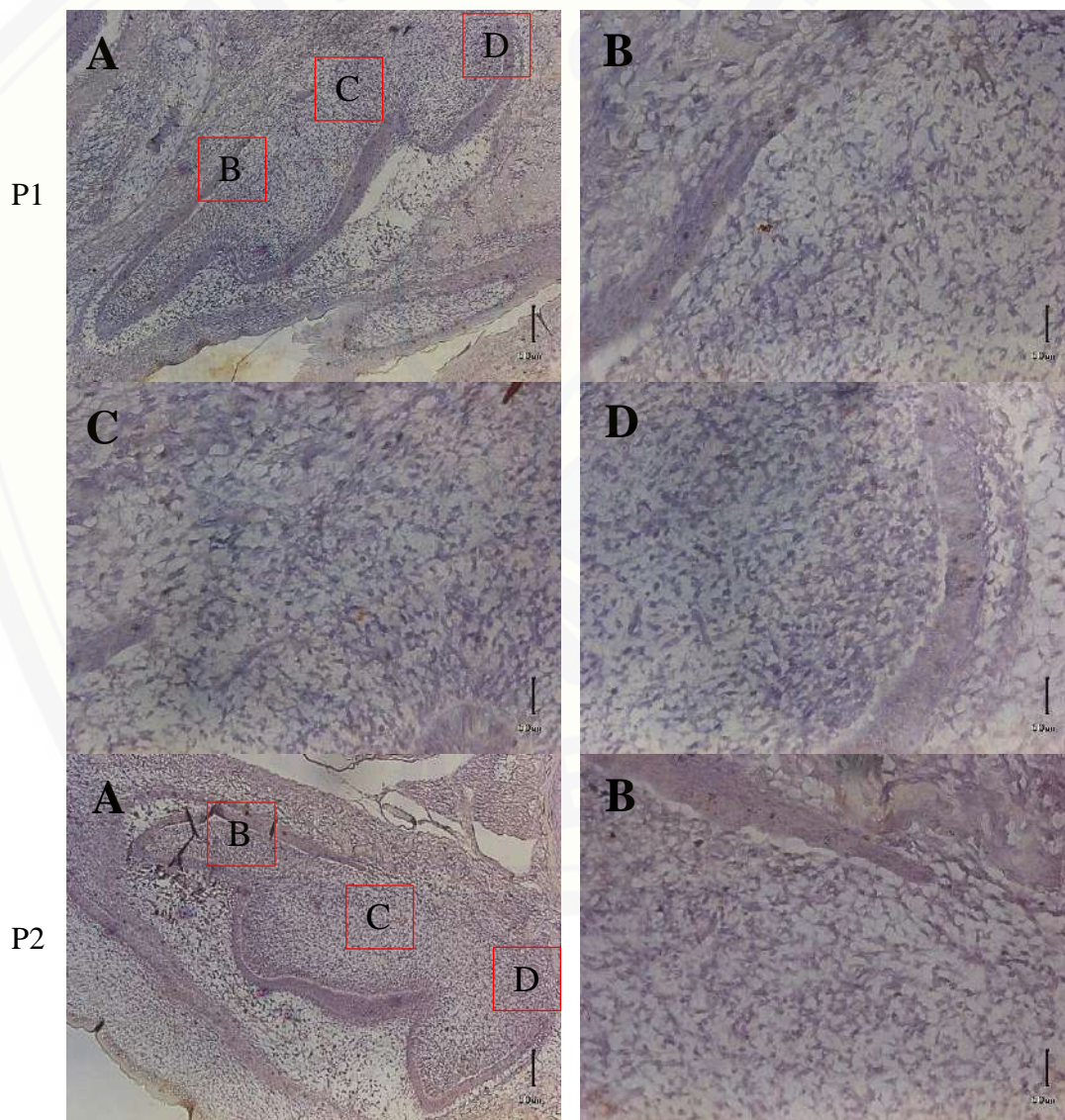
- A : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok kontrol dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 perbesaran 100x. menunjukkan (B) lapang pandang 1; (C) lapang pandang 2; (D) lapang pandang 3 yang akan dilakukan pengamatan ekspresi IGF-1.
- B : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok kontrol dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 1. Perbesaran 400x.

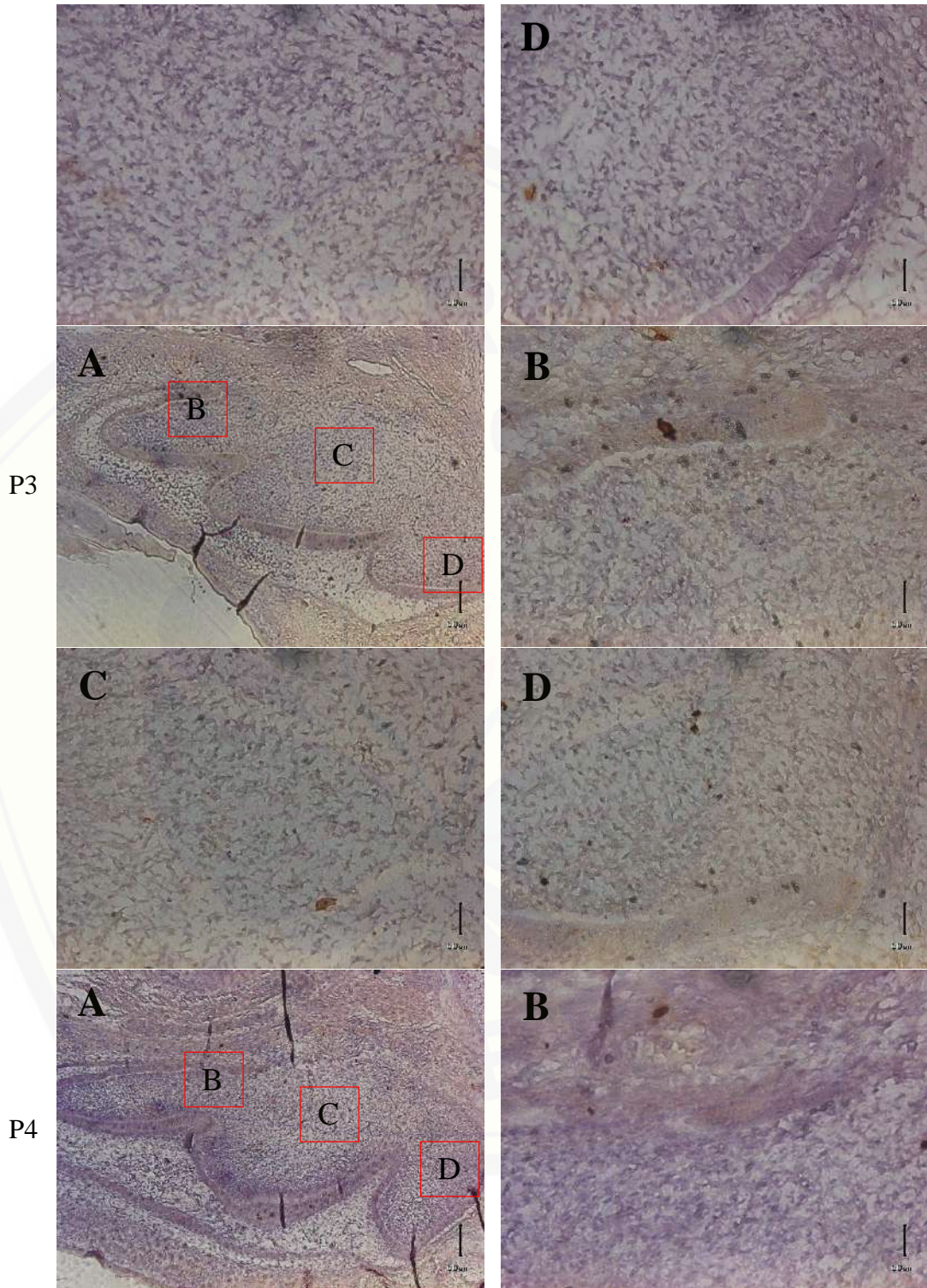


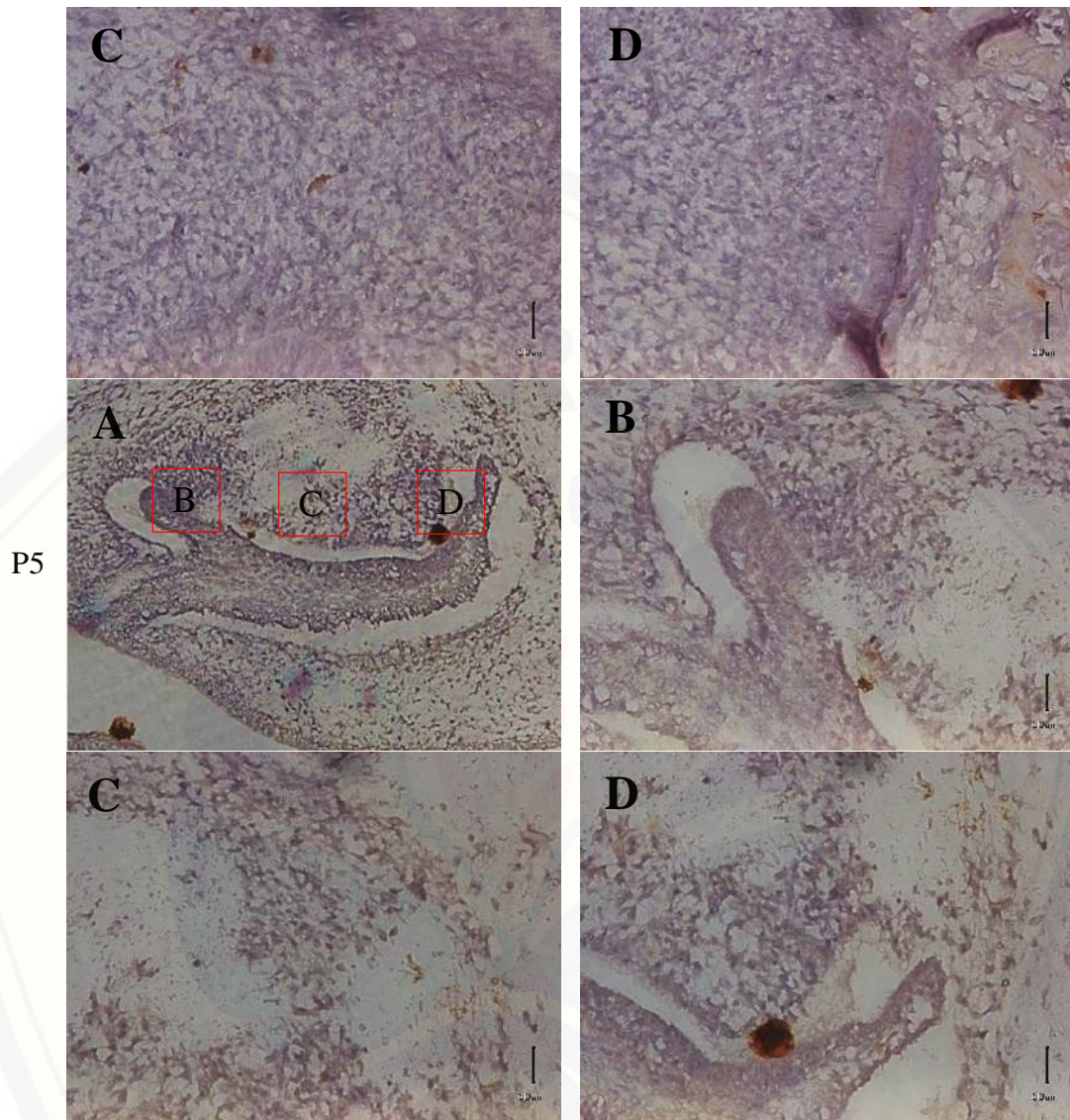
C : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok kontrol dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 2. Perbesaran 400x.

D : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok kontrol dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 3. Perbesaran 400x.

## H.2 Gambaran Histologis Benih Gigi M1 Maksila Kanan Anak Tikus Kelompok Perlakuan dengan Pewarnaan IHC Menggunakan Antibodi IGF-1





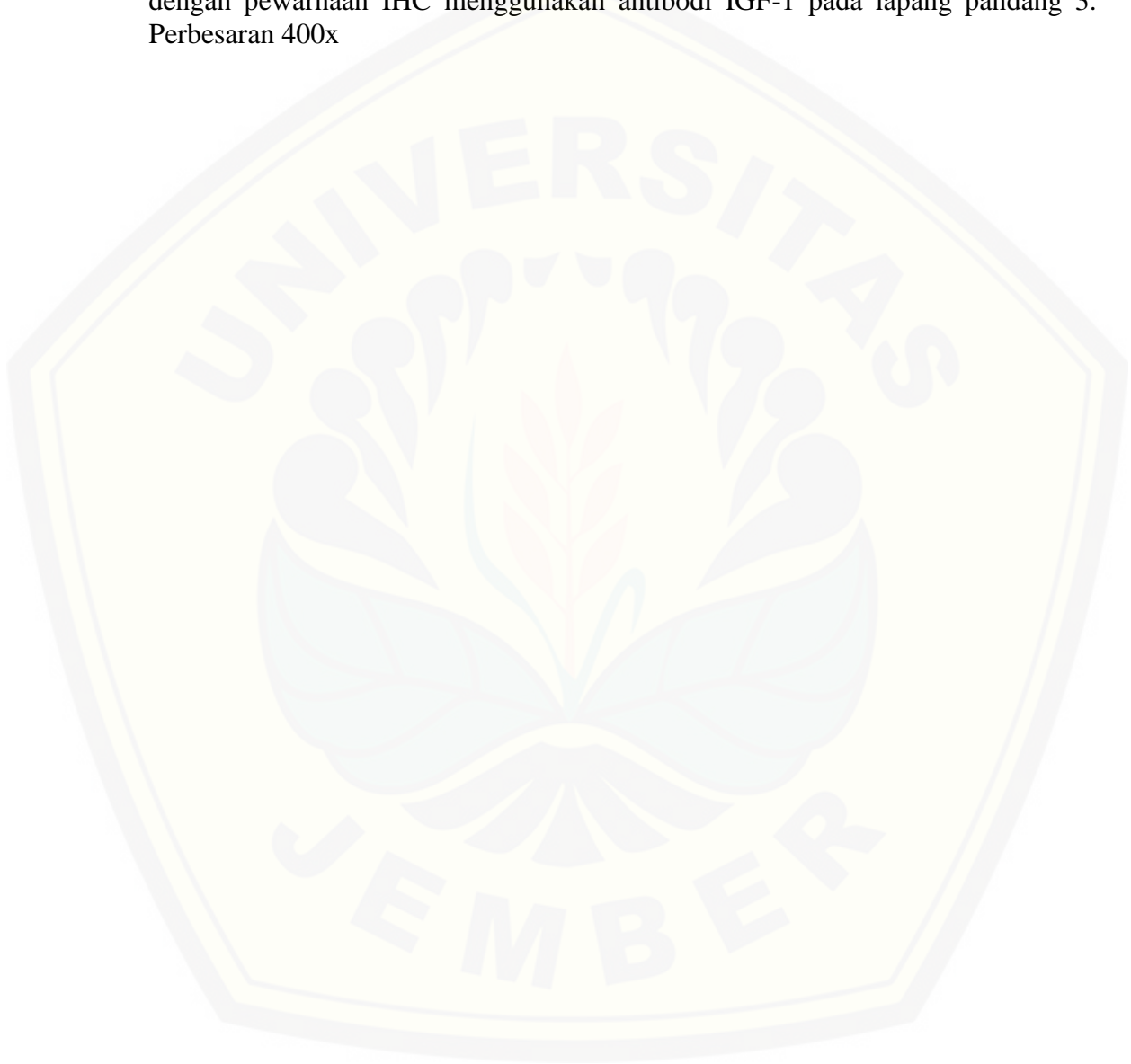


Keterangan:

A : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 perbesaran 100x. menunjukkan (B) lapang pandang 1; (C) lapang pandang 2; (D) lapang pandang 3 yang akan dilakukan pengamatan ekspresi IGF-1.

B : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 1. Perbesaran 400x.

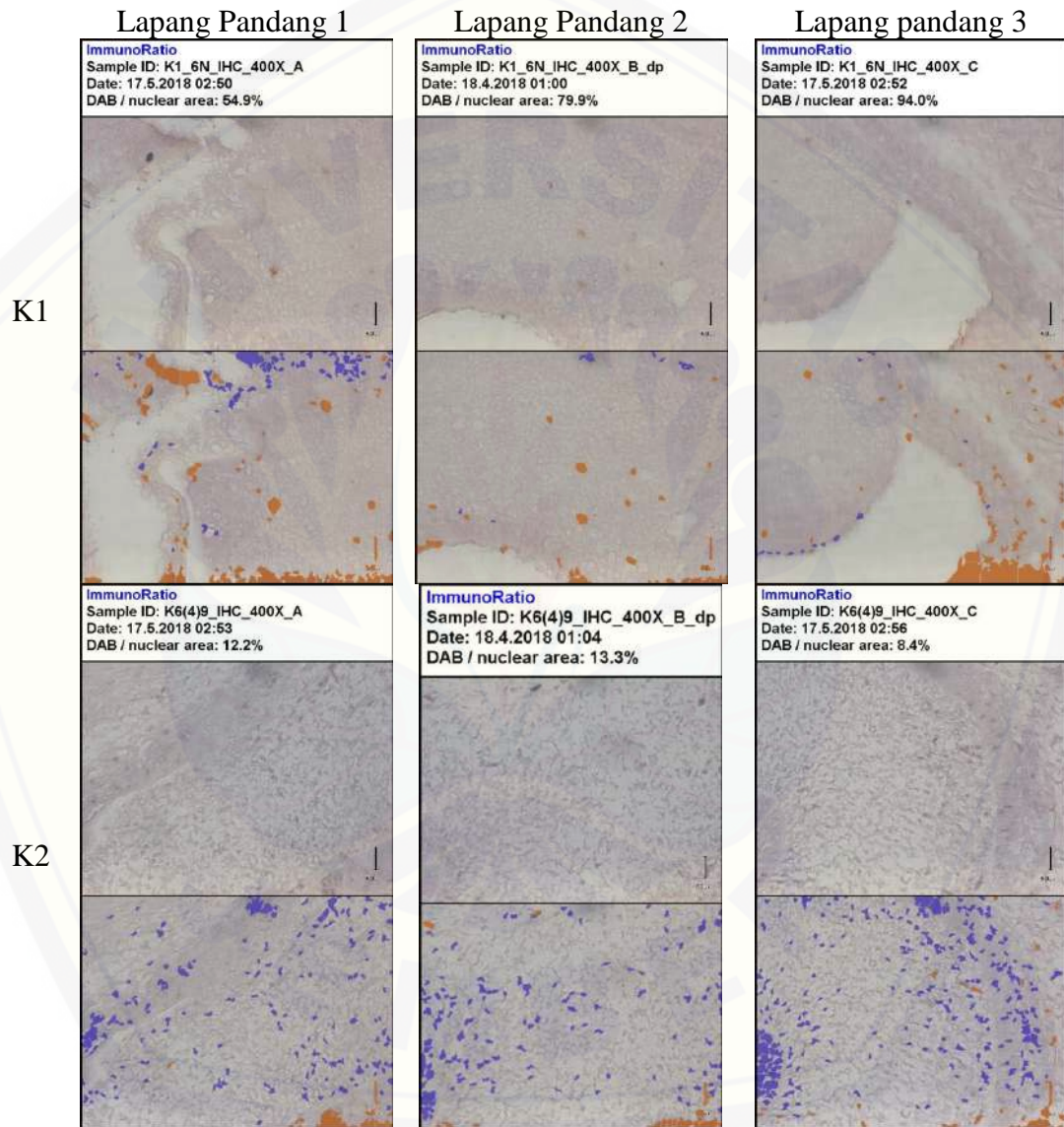
- C : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 2. Perbesaran 400x
- D : Gambaran histologis benih gigi M1 maksila kanan anak tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan IHC menggunakan antibodi IGF-1 pada lapang pandang 3. Perbesaran 400x



**LAMPIRAN I. Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 Menggunakan Software**

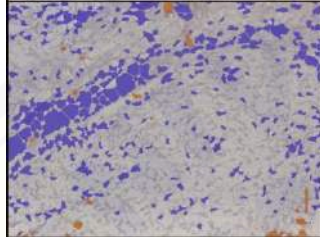
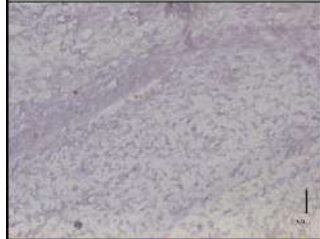
*ImmunoRatio*

I.1 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada Benih Gigi M1 Kelompok Kontrol

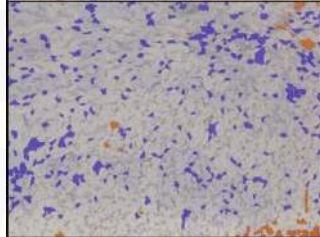


K3

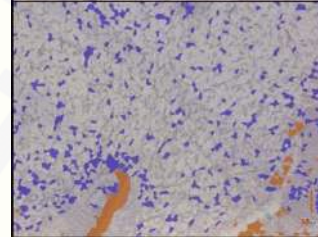
ImmunoRatio  
Sample ID: K7(8)5\_IHC\_400X\_A  
Date: 17.5.2018 02:56  
DAB / nuclear area: 3.8%



ImmunoRatio  
Sample ID: K7(8)5\_IHC\_400X\_B\_dp  
Date: 18.4.2018 01:08  
DAB / nuclear area: 8.6%

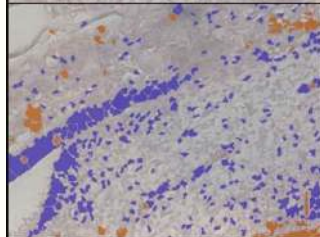


ImmunoRatio  
Sample ID: K7(8)5\_IHC\_400X\_C  
Date: 17.5.2018 02:58  
DAB / nuclear area: 11.8%

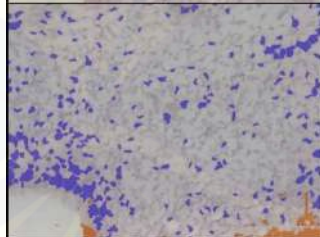
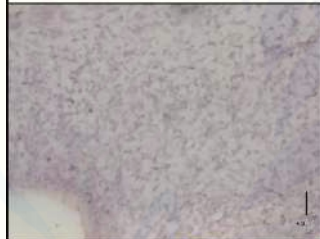


K4

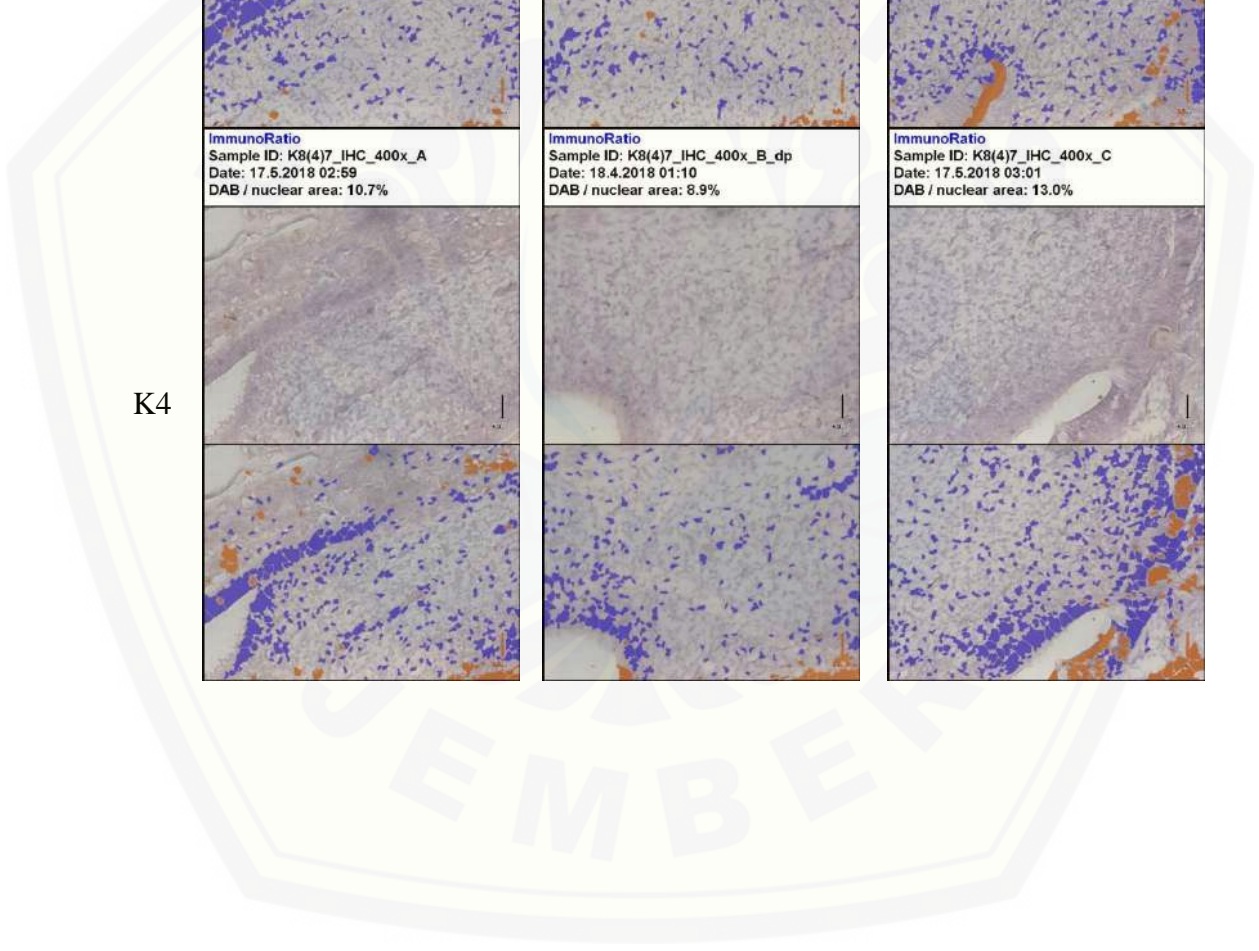
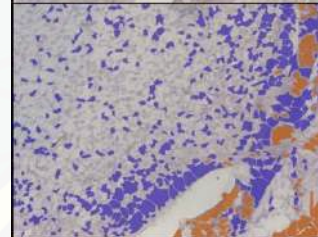
ImmunoRatio  
Sample ID: K8(4)7\_IHC\_400x\_A  
Date: 17.5.2018 02:59  
DAB / nuclear area: 10.7%

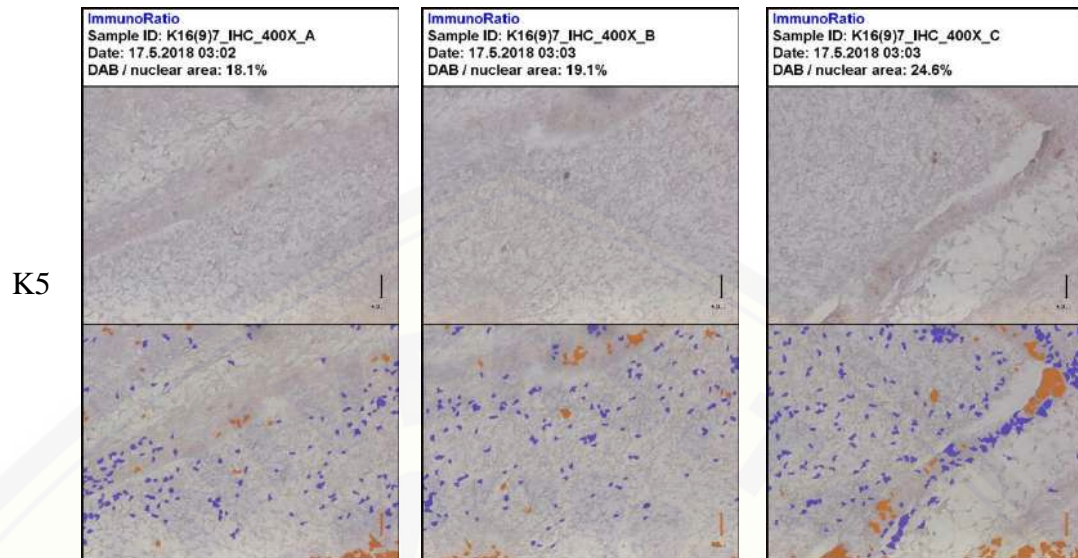


ImmunoRatio  
Sample ID: K8(4)7\_IHC\_400x\_B\_dp  
Date: 18.4.2018 01:10  
DAB / nuclear area: 8.9%

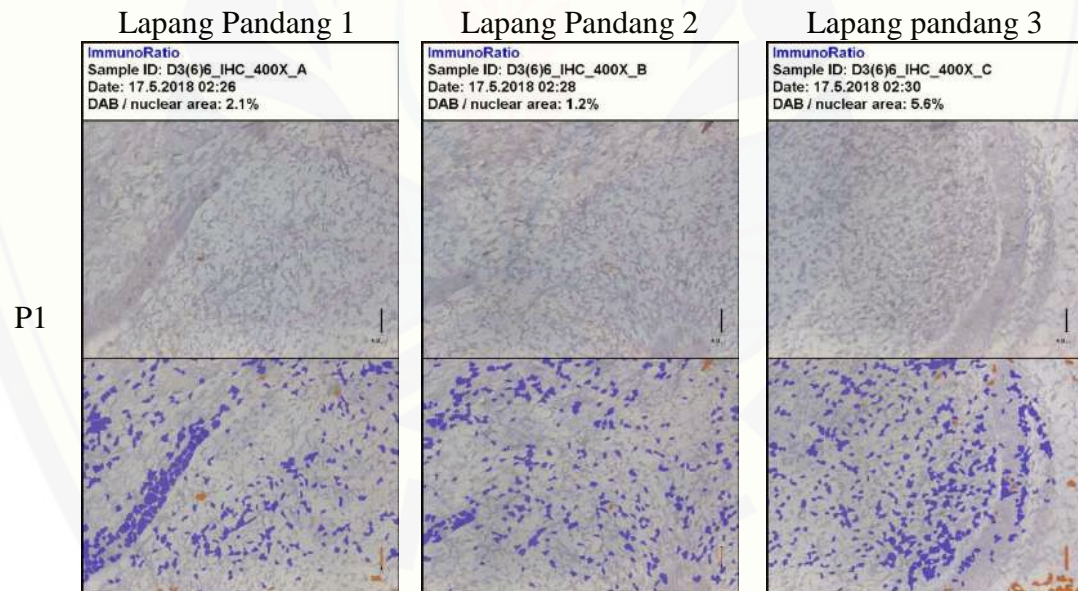


ImmunoRatio  
Sample ID: K8(4)7\_IHC\_400x\_C  
Date: 17.5.2018 03:01  
DAB / nuclear area: 13.0%

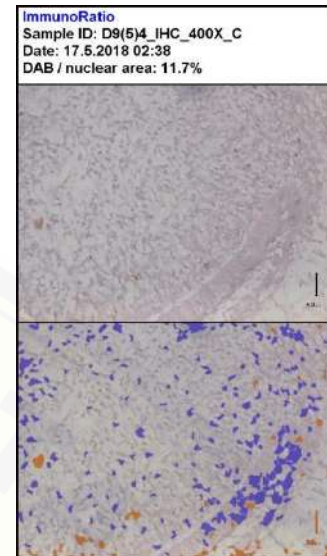
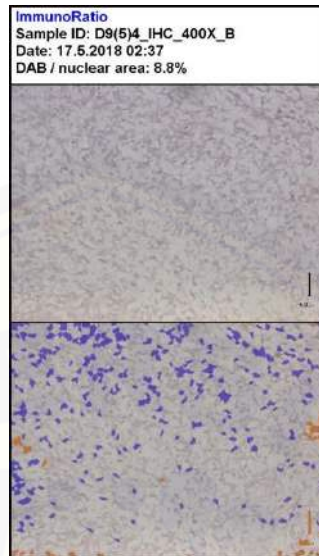
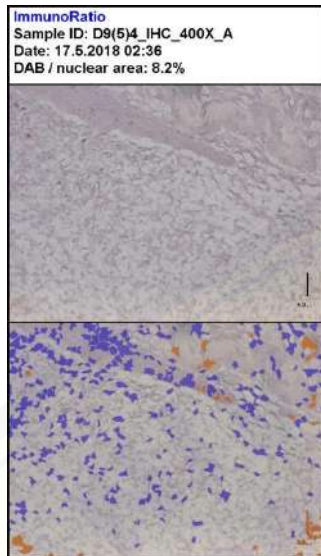




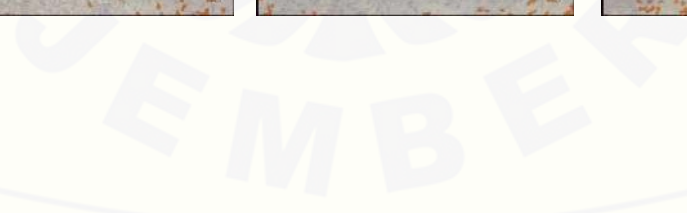
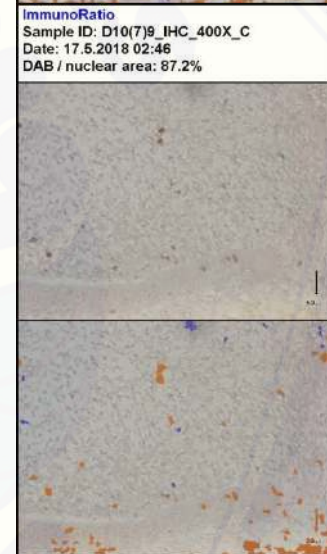
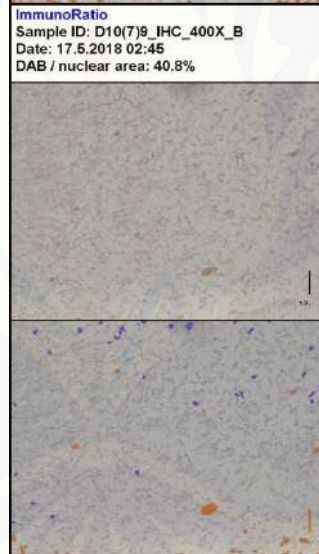
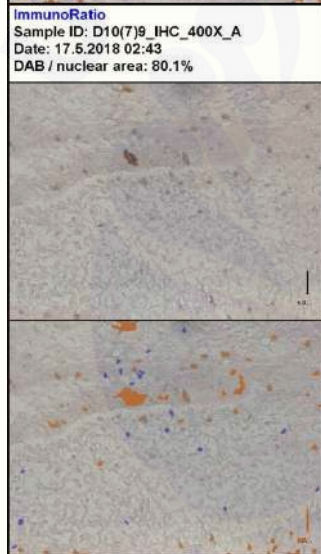
I.2 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada Benih Gigi M1 Kelompok Perlakuan



P2



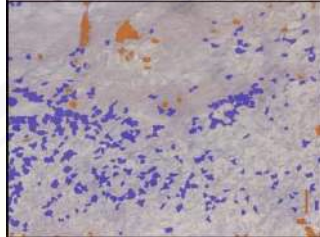
P3



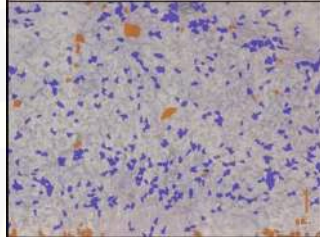
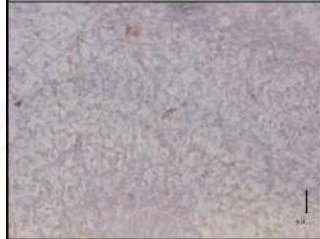


P4

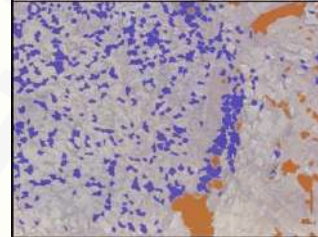
**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D13(7)7\_IHC\_400X\_A  
 Date: 17.5.2018 02:47  
 DAB / nuclear area: 9.5%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D13(7)7\_IHC\_400X\_B  
 Date: 17.5.2018 02:48  
 DAB / nuclear area: 9.2%

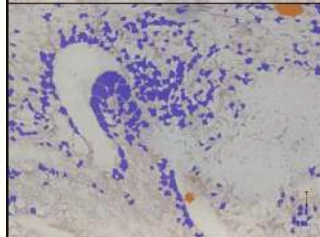
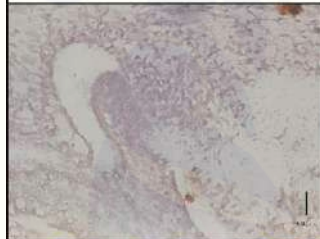


**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D13(7)7\_IHC\_400X\_C  
 Date: 17.5.2018 02:49  
 DAB / nuclear area: 15.4%

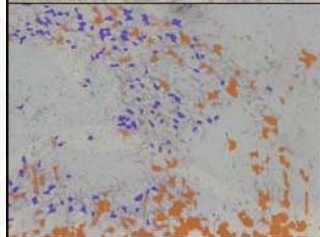


P5

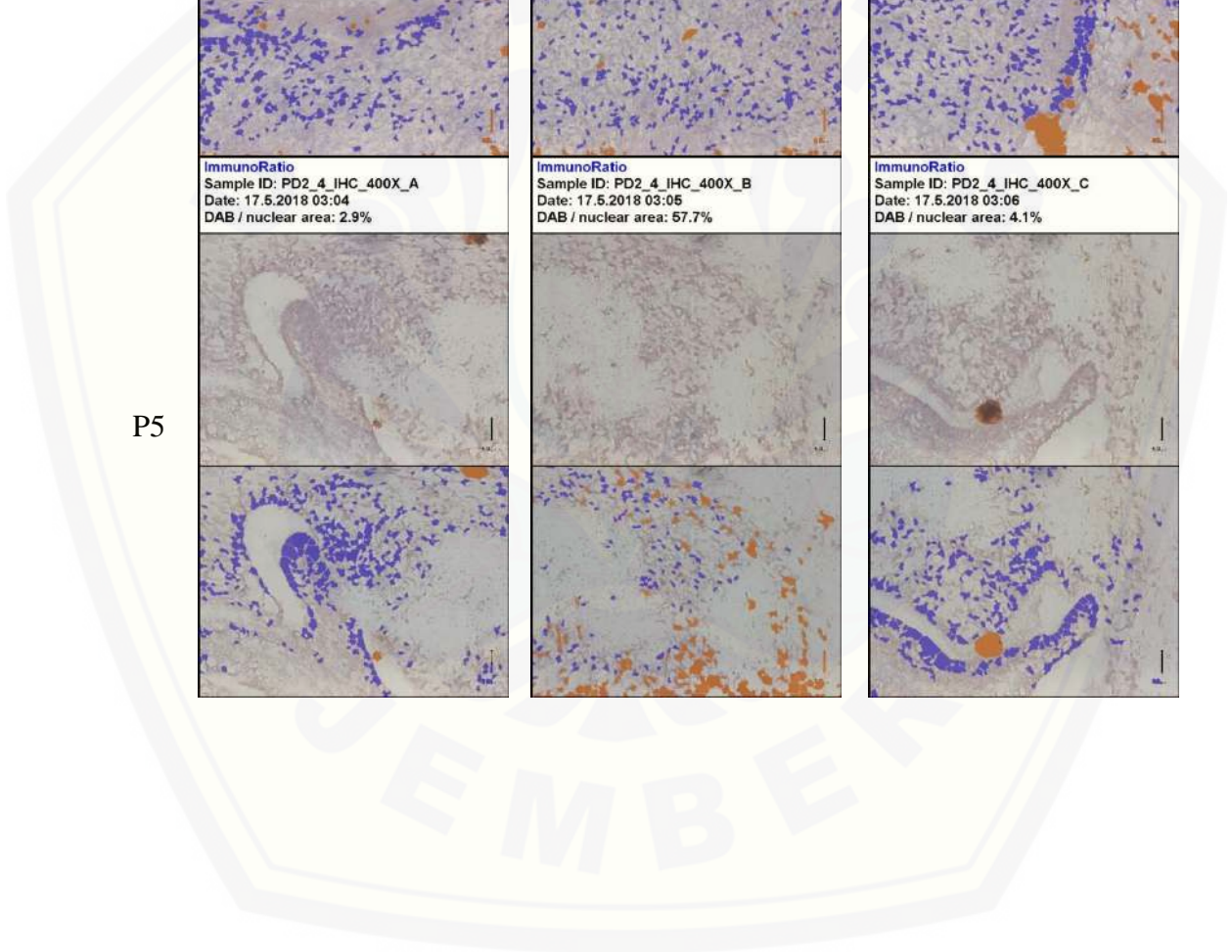
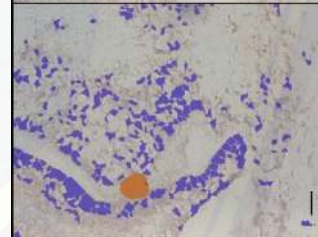
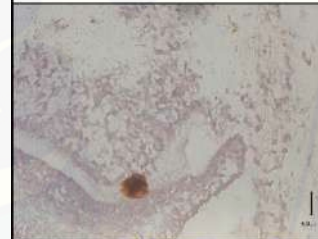
**ImmunoRatio**  
 Sample ID: PD2\_4\_IHC\_400X\_A  
 Date: 17.5.2018 03:04  
 DAB / nuclear area: 2.9%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: PD2\_4\_IHC\_400X\_B  
 Date: 17.5.2018 03:05  
 DAB / nuclear area: 57.7%



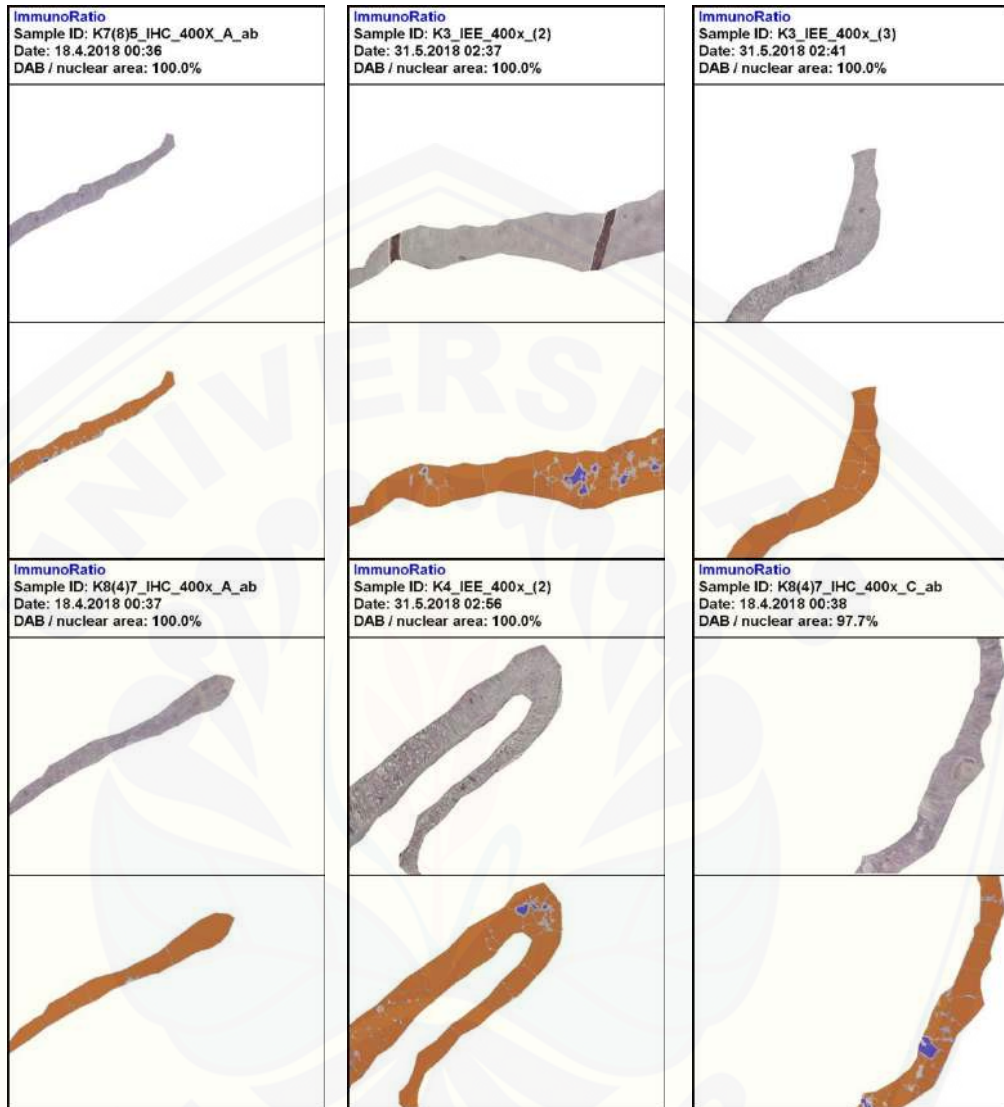
**ImmunoRatio**  
 Sample ID: PD2\_4\_IHC\_400X\_C  
 Date: 17.5.2018 03:06  
 DAB / nuclear area: 4.1%



I.3 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada IEE Kelompok Kontrol



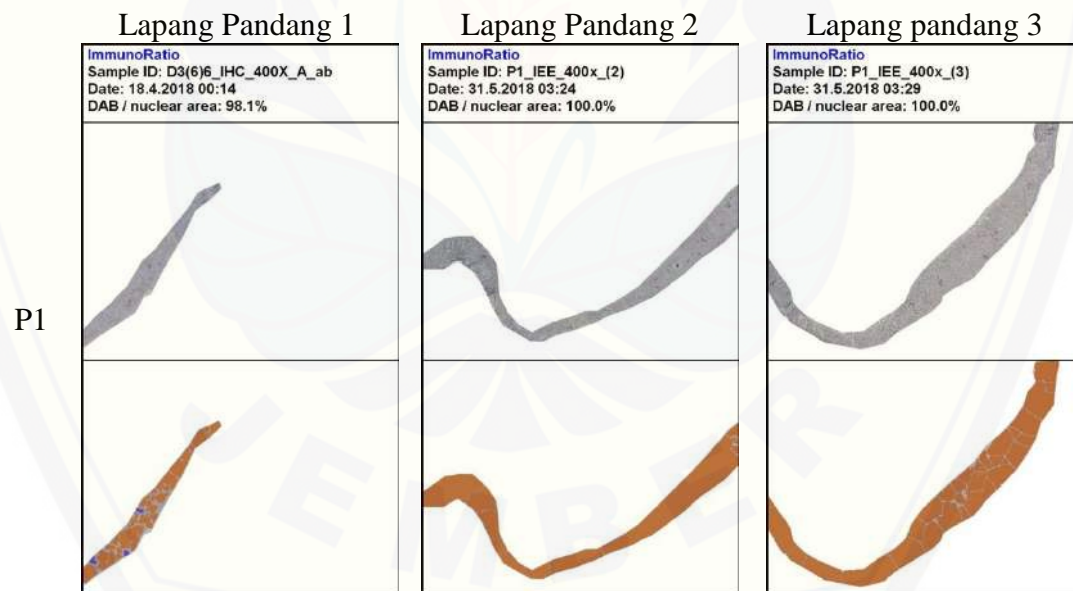
K3



K4



I.4 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada IEE Kelompok Perlakuan



P2

**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D9(5)4\_IHC\_400X\_A\_ab  
 Date: 18.4.2018 00:17  
 DAB / nuclear area: 54.2%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: P2\_IEE\_400x\_(2)  
 Date: 31.5.2018 03:36  
 DAB / nuclear area: 100.0%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D9(5)4\_IHC\_400X\_C\_ab  
 Date: 18.4.2018 00:18  
 DAB / nuclear area: 100.0%



P3

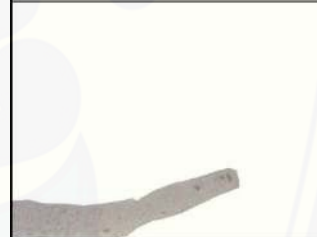
**ImmunoRatio**  
 Sample ID: P3\_IEE\_400x\_(1)  
 Date: 31.5.2018 03:56  
 DAB / nuclear area: 100.0%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: P3\_IEE\_400x\_(2)  
 Date: 31.5.2018 04:06  
 DAB / nuclear area: 100.0%



**ImmunoRatio**  
 Sample ID: D10(7)9\_IHC\_400X\_C\_ab  
 Date: 18.4.2018 00:20  
 DAB / nuclear area: 45.9%



P4

**ImmunoRatio**  
Sample ID: D13(7)7\_IHC\_400X\_A\_ab  
Date: 18.4.2018 00:21  
DAB / nuclear area: 100.0%



**ImmunoRatio**  
Sample ID: P4\_IEE\_400x\_(2)  
Date: 31.5.2018 04:17  
DAB / nuclear area: 100.0%



**ImmunoRatio**  
Sample ID: P4\_IEE\_400x\_(3)  
Date: 31.5.2018 04:21  
DAB / nuclear area: 100.0%



P5

**ImmunoRatio**  
Sample ID: PD2\_4\_IHC\_400X\_A\_ab  
Date: 18.4.2018 00:23  
DAB / nuclear area: 97.9%



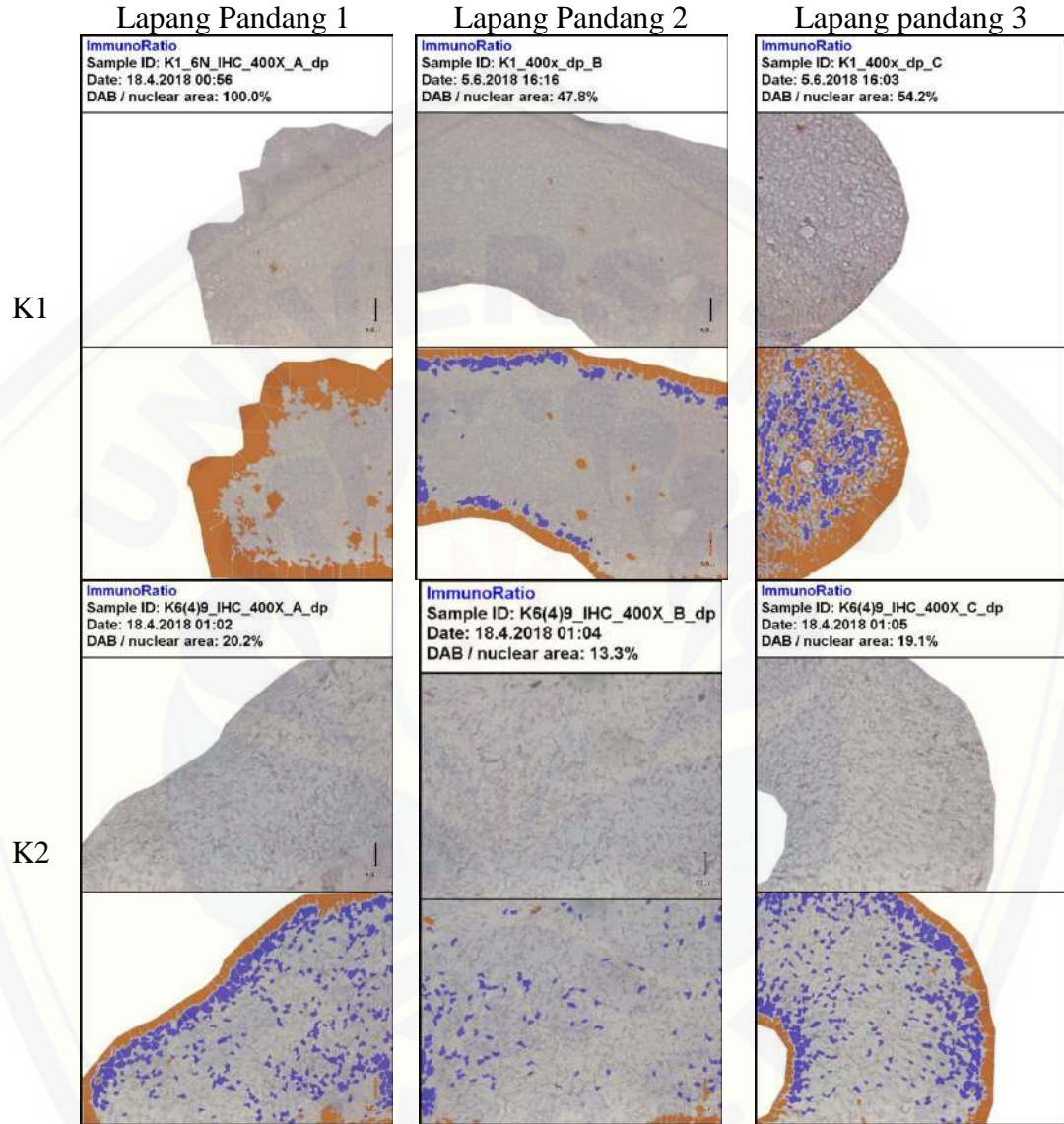
**ImmunoRatio**  
Sample ID: P5\_IEE\_400x\_(2)  
Date: 31.5.2018 04:28  
DAB / nuclear area: 100.0%



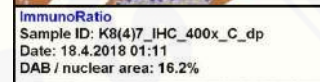
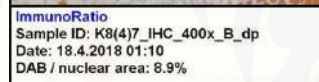
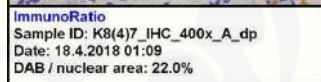
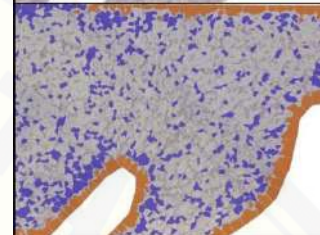
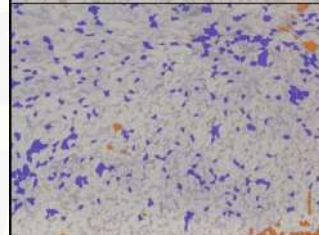
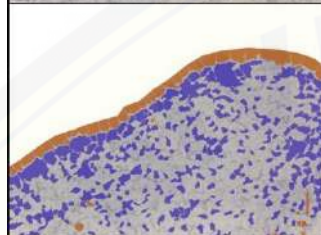
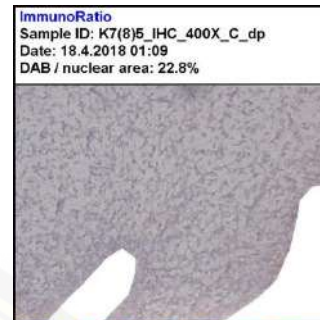
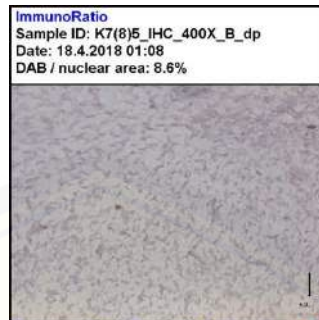
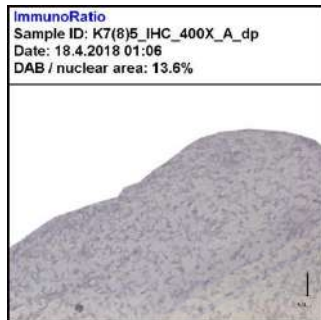
**ImmunoRatio**  
Sample ID: PD2\_4\_IHC\_400X\_C\_ab  
Date: 18.4.2018 00:24  
DAB / nuclear area: 100.0%



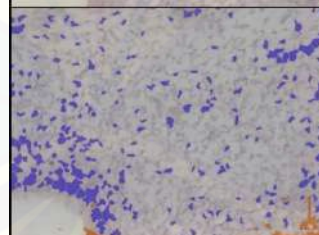
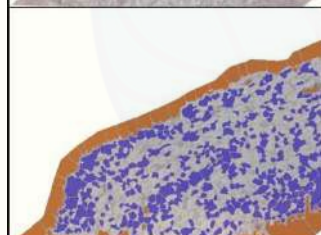
I.5 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila Kelompok Kontrol



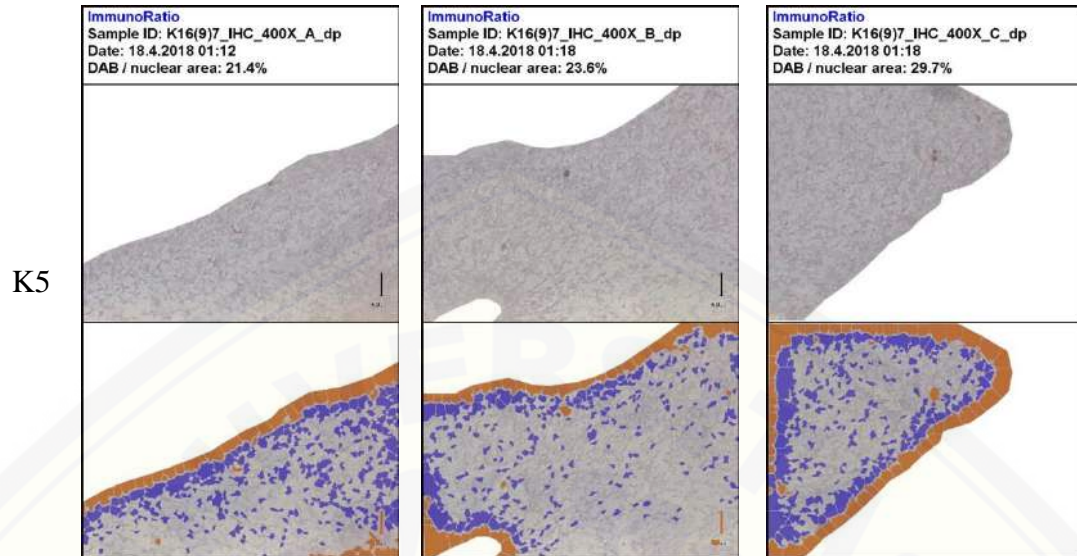
K3



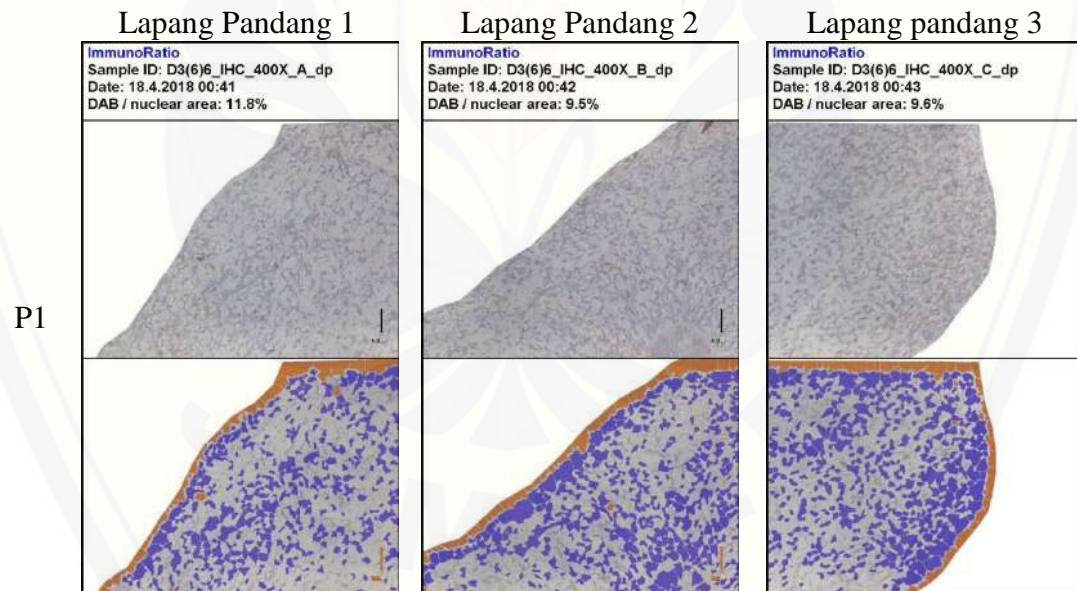
K4



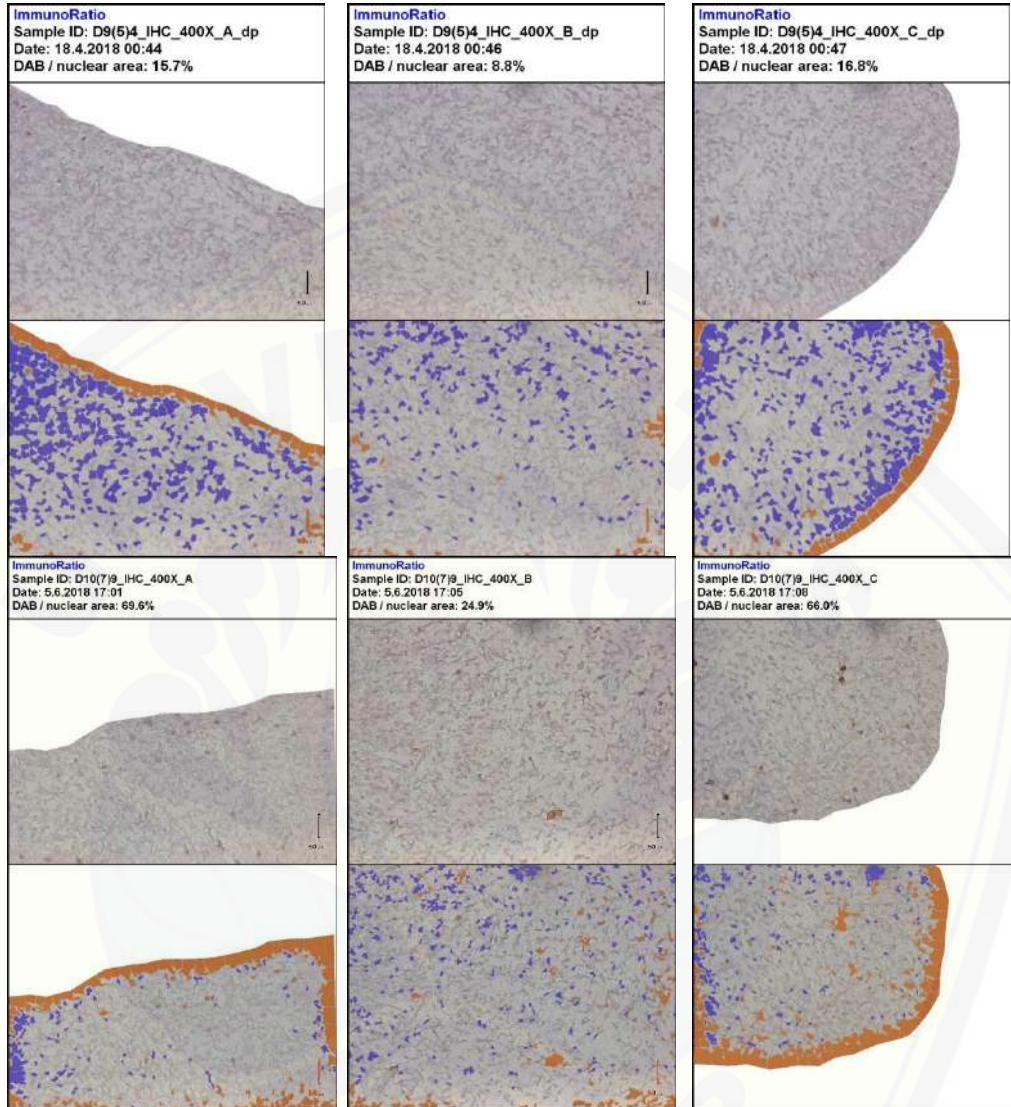




I.6 Gambaran Hasil Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila Kelompok Perlakuan

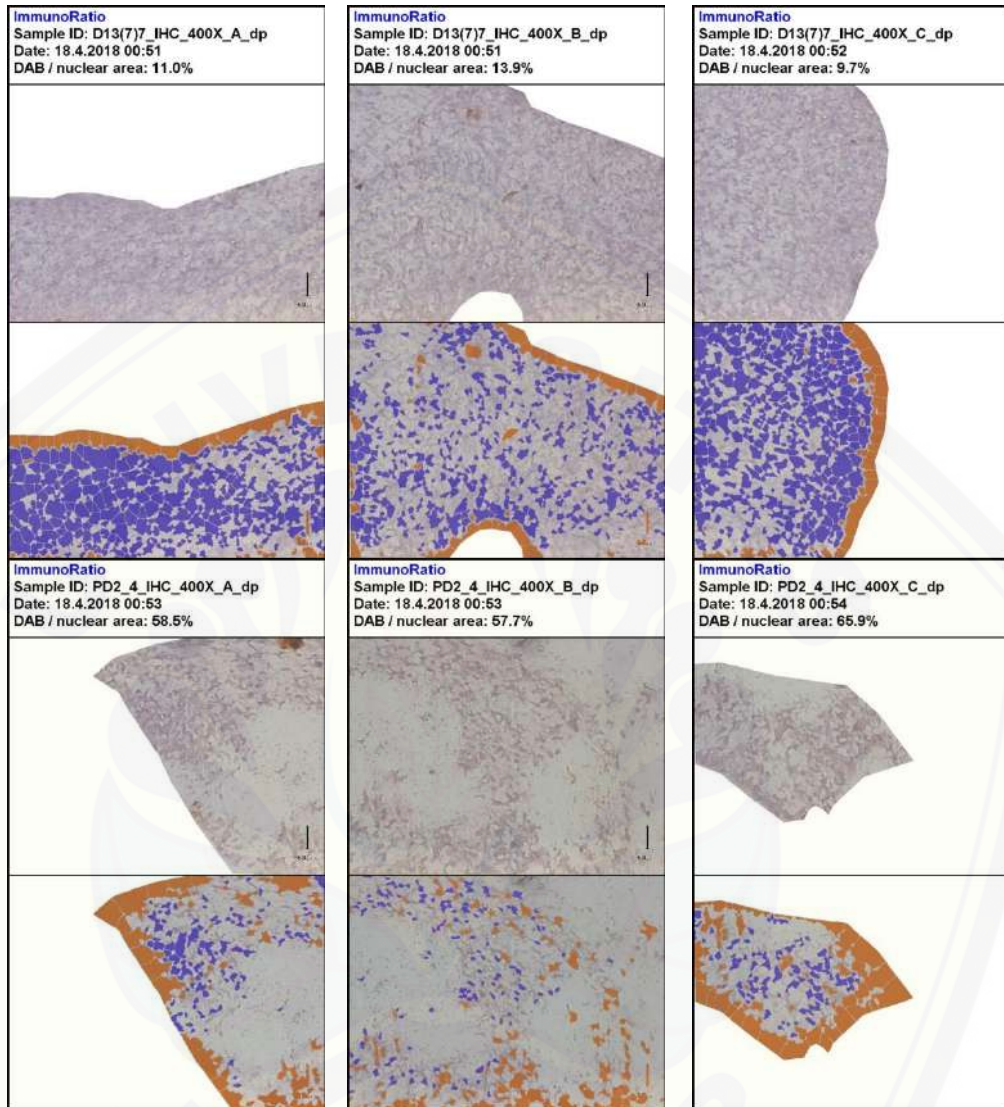


P2



P3

P4



P5

**LAMPIRAN J. Perhitungan Rata-Rata Ekspresi IGF-1**

## J.1 Perhitungan Rata-Rata Ekspresi IGF-1 pada IEE Benih Gigi M1 Maksila

## Kelompok Kontrol dan Perlakuan

	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	$\bar{X}$
K1	95,80%	100%	100%	98,60%
K2	100%	100%	100%	100%
K3	100%	100%	100%	100%
K4	100%	100%	97,70%	99,23%
K5	99,50%	100%	77,10%	92,20%
P1	98,10%	100%	100%	99,36%
P2	54,20%	100%	100%	84,73%
P3	100%	100%	45,90%	81,96%
P4	100%	100%	97,80%	99,26%
P5	97,90%	100%	100%	99,30%

## J.2 Perhitungan Rata-Rata Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila Benih Gigi M1 Maksila

## Kelompok Kontrol dan Perlakuan

	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	$\bar{X}$
K1	100%	47,80%	54,20%	67,33%
K2	20,20%	13,30%	19,10%	17,53%
K3	13,60%	8,60%	22,80%	15%
K4	22%	8,90%	16,20%	15,70%
K5	21,40%	23,60%	29,70%	24,90%
P1	11,80%	9,50%	9,60%	10,30%
P2	15,70%	8,80%	16,80%	13,76%
P3	69,60%	24,90%	66%	53,50%
P4	11%	13,90%	9,70%	11,53%
P5	58,50%	57,70%	65,90%	60,70%

**LAMPIRAN K. Hasil Uji Analisis Data****K.1 Uji Normalitas *Shapiro Wilk* Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus**

Tests of Normality							
Kelompok		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rata-Rata BB Anak Tikus	Kontrol	.367	5	.026	.684	5	.006
	Perlakuan	.473	5	.001	.552	5	.000

a. Lilliefors Significance Correction

**K.2 Uji Homogenitas *Levene-Test* Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus****Test of Homogeneity of Variances**

Rata-Rata BB Anak Tikus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.524	1	8	.252

**K.3 Uji *Mann-Whitney* Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus****Test Statistics<sup>b</sup>**

	Rata-Rata Berat Badan Anak Tikus
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.739
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

K.4 Uji Normalitas *Shapiro Wilk* Ekspresi IGF-1 pada IEE M1 Maksila Anak Tikus

Tests of Normality							
Kelompok		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IGF-1 pada IEE	Kontrol	.371	5	.023	.701	5	.010
	Perlakuan	.364	5	.029	.735	5	.021

a. Lilliefors Significance Correction

K.5 Uji Homogenitas *Levene-Test* Ekspresi IGF-1 pada IEE M1 Maksila Anak Tikus

## Test of Homogeneity of Variances

IGF-1 pada IEE

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
17.481	1	8	.003

K.6 Uji *Mann-Whitney* Ekspresi IGF-1 pada IEE M1 Maksila Anak TikusTest Statistics<sup>b</sup>

	IGF-1 pada IEE
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.733
Asymp. Sig. (2-tailed)	.463
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

K.7 Uji Normalitas *Shapiro Wilk* Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila M1 Maksila Anak Tikus

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IGF-1 pada dental papila	Kontrol	.357	5	.036	.689	5	.007
	Perlakuan	.342	5	.056	.765	5	.041

K.8 Uji Homogenitas *Levene-Test* Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila M1 Maksila Anak Tikus

Test of Homogeneity of Variances

IGF-1 pada dental papila

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.819	1	8	.392

H.9 Uji *Mann-Whitney Test* Ekspresi IGF-1 pada Dental Papila M1 Maksila Anak Tikus

Test Statistics<sup>b</sup>

	IGF-1 pada dental papila
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-.940
Asymp. Sig. (2-tailed)	.347
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 <sup>a</sup>