

Arsitektur dan Komposisi Mineral Atom Tulang Korpus Mandibula Tikus dengan Perbedaan Konsistensi Diet

(Bone Architecture and Atomic Mineral Composition in The Mandibular Corpus of Rats with Different Diet Consistency)

Nur Masita Silviana¹, Nur Alma Aulia²

¹ Departemen Ortodonti, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya

² Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Abstrak

Konsistensi fisik makanan dapat mempengaruhi kekuatan yang diberikan selama kontraksi otot saat mengunyah makanan melalui beban yang dikirim ke tulang mandibula. Sifat mekanis tulang ditentukan oleh arsitektur trabekula meliputi dinding dan rongga. Perbedaan mikrostruktur tulang dipengaruhi oleh sifat-sifat atom yang bersubstitusi membentuk komposit. Tujuan Penelitian adalah untuk menganalisis pengaruh konsistensi diet terhadap arsitektur dan komposisi mineral atom tulang korpus mandibula. Penelitian ini menggunakan delapan belas tikus jantan wistar yang berumur 3 minggu dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, diet padat/*hard diet* (HD), diet lunak/*soft diet* (SD) dan diet cair/*liquid diet* (LD). Setelah delapan minggu percobaan, tikus dikorbankan. Korpus mandibula kanan diperiksa untuk mempelajari efek dari beban fungsional pengunyahan terhadap arsitektur dan komposisi mineral atom tulang. Analisa kualitatif gambaran SEM menunjukkan bahwa kelompok HD memiliki arsitektur tulang terbaik dibandingkan kelompok lainnya. Komposisi atom Ca, Fe dan rasio Ca/P pada kelompok HD juga lebih tinggi berdasarkan pemeriksaan SEM-EDX. Hasil Penelitian pada korpus mandibula ini menunjukkan bahwa aktifitas otot pengunyahan melalui konsistensi diet yang dikonsumsi dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas mineral atom tulang. Diperlukan penelitian lebih lanjut agar dapat menjelaskan mekanisme molekuler bagaimana mineral atom dapat berperan dalam mempengaruhi kualitas tulang.

Kata kunci: arsitektur tulang, korpus mandibula, mineral atom, SEM, SEM-EDX

Abstract

The physical consistency of diet can affect the force exerted during muscle contraction when chewing food from the load sent to the mandible and cause adaptation of bone structure. The mechanical properties of bone are determined by the architecture of the trabeculae covering the walls and spaces. The difference in bone microstructure are influenced by the properties of the atoms that substitute for the composite. This study aimed to analyze the effect of dietary consistency on bone architecture and atomic mineral composition of the mandibular corpus. This study used eighteen male wistar rats aged 3 weeks were randomly divided into three groups, the hard diet (HD), the soft diet (SD) and the liquid diet (LD). After eight weeks the mice were sacrificed. The right mandibular corpus was examined to study the effect of masticatory functional load on the architecture and atomic mineral composition of bone. Qualitative analysis of SEM images showed that the HD group had the best bone architecture compared to the other groups. The atomic composition of Ca, Fe and Ca/P ratio in the HD group were also higher based on SEM-EDX examination. The results of this study on the mandibular corpus showed that masticatory muscle activity through the consistency of the diet consumed could affect the bone quality and quantity of atomic mineral composition. Further research is needed to elucidate the molecular mechanisms of how atomic minerals can play a role in influencing bone quality.

Keywords: bone architecture, mandibular corpus, atomic mineral, SEM, SEM-EDX

Korespondensi (Correspondence) : Nur Masita Silviana. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya. Jl. Veteran, Malang 65145. Email: nurmasita.fk@ub.ac.id

Mastikasi merupakan proses mengunyah yang melibatkan gerakan mandibula dan otot-otot di sekeliling sendi temporomandibular. Aktivitas otot pengunyahan tersebut, serta beban yang dikirim ke tulang rahang atas dapat bervariasi, diantaranya tergantung pada konsistensi fisik diet yang dikonsumsi.¹ Seiring perkembangan teknologi dan industri, sebagian besar makanan di era saat ini konsistensinya lebih lunak dibandingkan jaman dulu. Banyak studi yang menyatakan bahwa konsistensi diet yang lebih padat akan meningkatkan aktivitas otot pengunyahan sehingga merangsang aktivitas seluler dan menghasilkan kualitas tulang yang lebih baik.² Volume tulang juga telah terbukti mengalami penurunan pada hewan yang diberi

makanan dengan konsistensi yang lunak.³ Penelitian lain juga menunjukkan bahwa diet padat menghasilkan tingkat mineralisasi tulang trabekular yang lebih tinggi secara signifikan di kondilus, bila dibandingkan dengan hewan yang diberi diet lunak. Beban aktivitas fisik pengunyahan tersebut dapat meningkatkan kualitas tulang, serta memicu aposisi atau resorpsi tulang di beberapa area tertentu.^{1,4}

Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa aktivitas fisik dan latihan otot dapat meningkatkan sirkulasi darah dan laju metabolisme. Selain kalsium (Ca) dan fosfor (P) sebagai unsur utama hidroksiapatit, ada keterlibatan logam berat yang diketahui dapat mempengaruhi metabolisme maupun massa

tulang.^{5,6} Logam kromium (Cr) disebutkan memberi efek toksik pada sel tulang. Secara khusus, bentuk ion dari elemen-elemen ini mempengaruhi proliferasi, ukuran, dan bentuk osteoblas. Selain itu, Cr mampu mempengaruhi aktivitas osteoblas dengan menurunkan kadar alkaline phosphatase dan kalsium. Percobaan pada hewan dan penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa kromium heksavalen dapat menginduksi stres oksidatif dan memberikan efek sitotoksik pada sel tulang.^{7,8}

Kelebihan zat besi (Fe) dilaporkan dapat mengintensifkan resorpsi tulang dan stres oksidatif.⁹ Stres oksidatif yang terjadi pada jaringan periodontal dapat mengganggu distribusi oksigen dan nutrisi dalam pembuluh darah. Gangguan yang terjadi dalam pembuluh darah berpengaruh terhadap metabolisme sehingga memicu terjadinya toksikasi jaringan penyangga, baik periodontal dan gingiva.¹⁰ Logam nikel (Ni) juga disebutkan dapat menurunkan penyerapan oksigen dan menambah akumulasi lemak hati.¹¹ Pada kondisi defisiensi tembaga (Cu), penurunan kekuatan tulang, gangguan pembentukan dan pertumbuhan tulang, berkurangnya mineralisasi tulang, berkurangnya osifikasi pusat pertumbuhan, dan integritas tulang rawan terganggu. Hewan dengan defisiensi tembaga menunjukkan tulang yang cacat, hipoplasia, tulang rapuh, dan mudah terjadi patah tulang. Efek defisiensi tembaga pada metabolisme tulang terutama terlihat pada bayi baru lahir yang terkena *Menkes disease*. Gangguan neurodegeneratif akibat *Menkes disease* menyebabkan terganggunya penyerapan tembaga, pertumbuhan tulang terhambat, osteoporosis, dan bertambah lebarnya metafisis tulang panjang.⁸

Sebagian besar tulang panjang berkembang secara endokondral, sedangkan tulang tengkorak dan wajah umumnya berkembang melalui osifikasi intramembran. Kedua proses tersebut dapat ditemukan dalam perkembangan mandibula, yaitu, osifikasi endokondral yang terjadi pada kondilus, dan osifikasi intramembran yang berperan dalam pengembangan korpus. Oleh karena itu, mandibula merupakan model yang baik untuk mempelajari perbedaan struktur tulang, mineralisasi, dan komposisi mineral antara kedua proses ini. Mandibula juga merupakan salah satu tulang yang mengalami pengerasan awal selama perkembangan janin, sehingga memungkinkan untuk mempelajari perkembangan tulang pada tahap awal tumbuh kembang. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa kondilus tumbuh terutama ke arah superoposterior sedangkan osifikasi korpus dimulai dari pusat pertumbuhan primer mandibula di sekitar regio molar, kemudian berlanjut ke arah anterior, posterior, dan lateral.^{1,3}

Suatu beban yang diterima tulang alveolar dapat merangsang aktivasi osteoblas dan osteoklas. Beban yang terlalu kecil tidak memberi dampak yang berarti terhadap kepadatan tulang alveolar, sebaliknya, beban yang terlalu besar dapat memberi dampak yang negatif.¹² Meskipun telah ada beberapa penelitian yang berfokus pada bagaimana beban mekanik melalui aktivitas otot mastikasi dapat berdampak pada kondilus mandibula, namun studi tentang pengaruhnya terhadap korpus mandibula masih terbatas. Area di sekitar korpus seringkali merupakan area gigi penjangkar pada perawatan ortodontik, penempatan implan ataupun penyangga untuk gigi tiruan. Oleh karena itu penting dipelajari faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kepadatan tulang di regio tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi apakah aktifitas fisik otot pengunyahan yang dimodifikasi melalui konsistensi diet yang berbeda dapat mempengaruhi arsitektur tulang korpus mandibula. Penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan komposisi atom mineral tulangnya dan kemungkinan pengaruhnya pada proses metabolisme tulang.

METODE PENELITIAN

Protokol penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dengan nomor terdaftar 269 / EC / KEPK / 07/2017. Sebanyak delapan belas ekor tikus wistar jantan usia sapih 3 minggu (berat badan rata-rata 60gr) dibagi secara acak menjadi 3 kelompok yang sama (6 ekor dalam setiap kelompok). Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol, diberi makan dengan pelet makanan tikus biasa, selanjutnya disebut kelompok diet padat atau *hard diet*/HD. Kelompok 2 merupakan kelompok dengan diet lunak atau *soft diet*/SD, diberi makan dengan pelet makanan tikus biasa yang dilunakkan dalam air dengan perbandingan 1: 1. Kelompok 3 sebagai kelompok dengan diet cair atau *liquid diet*/LD. Makanannya berupa campuran pelet dan air dengan rasio 1: 4. Masing-masing tikus dikurung dalam kandang yang terpisah. Tidak ada bahan atau benda lain yang dapat merangsang stimulus pengunyahan di dalam kandang. Berat badan dan kondisi fisik diperiksa setiap minggu untuk memantau pertumbuhan dan kesehatan hewan.

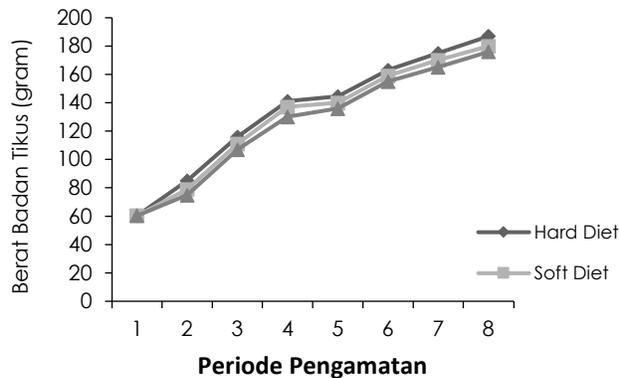
Setelah 8 minggu, semua tikus dikorbankan menggunakan pentobarbital sodium (50 mg/kg). Segera setelah pembedahan, tulang mandibula dipisahkan dari otot yang menempel. Spesimen yang telah bersih selanjutnya disimpan pada suhu -20°C. Pada saat akan dilakukan pengujian, sampel dicairkan dan direndam dalam larutan garam fisiologis pada suhu kamar dan *air dried*. Spesimen berupa tulang mandibula kanan

dipotong pada area korpus regio gigi molar. Potongan tulang tersebut kemudian dilapisi *gold palladium* dengan *sputtering process* (EMITECH SC7620 Sputter Coater). Pemeriksaan dilakukan menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) (ZeissTM Evo-MA10, Göttingen, Jerman) dengan pembesaran 1000x untuk menentukan arsitektur tulang, sedangkan untuk menentukan komposisi atom mineral tulang diperiksa dengan *SEM energy-dispersive X-ray spectroscopy* (SEM-EDX). Hasil pemeriksaan dianalisis dengan uji Kolmogorov-Smirnov Test untuk menguji normalitas, dilanjutkan dengan Tukey's post hoc test dari One-Way ANOVA. Perbedaan dianggap signifikan dengan $p < 0,05$.

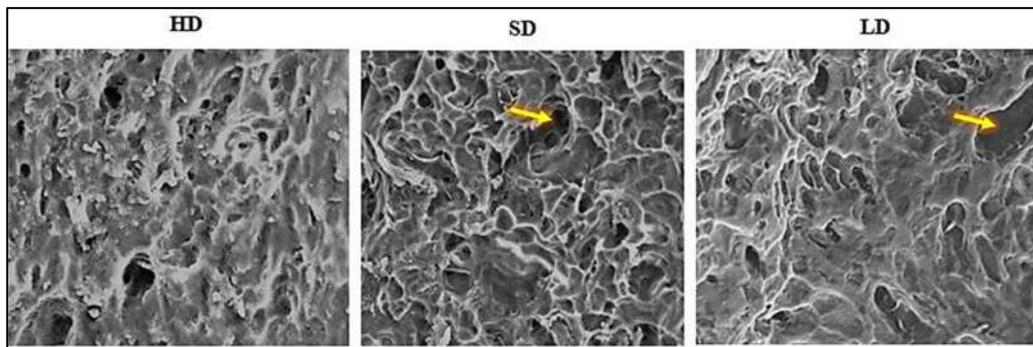
HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga kelompok eksperimen tidak menunjukkan adanya perubahan dalam pola pengunyahannya dengan konsistensi makanan yang berbeda. Ketiga kelompok rata-rata

menghabiskan asupan makanan yang diberikan setiap harinya. Tidak ada perbedaan yang signifikan dalam berat badan antara kelompok HD, SD dan LD selama 8 minggu percobaan (gambar 1). Berdasarkan gambaran SEM tulang korpus mandibula, menunjukkan adanya perbedaan arsitektur yang jelas diantara ketiga kelompok, Analisis kualitatif menunjukkan ketebalan dinding trabekula (*trabecular thickness/TbTh*) pada kelompok HD tampak paling tebal dan rata tanpa celah. Sebaliknya rongga trabekulanya (*trabecular space/TbSp*) paling sempit yang menunjukkan kepadatan tulang yang baik. Pada kelompok SD, mulai muncul retakan pada dinding trabekula namun antar rongga trabekula masih nampak terpisah dengan batas yang jelas. Sedangkan pada kelompok LD, banyak ditemukan pelebaran rongga trabekula (gambar 2). Hasil pengukuran rongga trabekula pada tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara ketiga kelompok, dengan kelompok LD yang ukuran rongganya paling lebar, $48.52 (\pm 4.65)$.



Gambar 1. Grafik perubahan berat badan tikus selama delapan minggu percobaan sejak usia sapih 3 minggu.



Gambar 2. Mikroarsitektur tulang

HD: *Hard Diet*/diet padat; SD: *Soft Diet*/diet lunak; LD: *Liquid Diet*/diet cair, dengan *Scanning Electrone Microscopy* (SEM) pembesaran 1000x. Panah kuning menunjukkan rongga trabekula (*trabecular space*).

Tabel 1. Konsentrasi mineral atom dengan pemeriksaan SEM energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX).

Konsentrasi mineral atom	Tipe Diet		
	HD	SD	LD
P (%)	14,92 + 1,72	19,07 + 1,09 ^a	21,09 + 0,76 ^{a,b}
Ca (%)	26,13 + 3,05	21,35 + 1,78	20,17 + 3,07 ^a
Cr (%)	0,78 + 0,22	0,81 + 0,37	0,89 + 0,35
Cu (%)	2,71 + 0,46	2,84 + 0,57	3,01 + 0,66
Fe (%)	1,51 + 0,64	1,32 + 0,46	1,08 + 0,87
Ni (%)	1,52 + 0,59	1,49 + 1,17	1,76 + 1,69
Ca/P ratio	1,31 + 0,08	1,22 + 0,18	1,05 + 0,11 ^a
TbTh (μm)	5,04 + 0,29	4,47 + 0,49	4,19 + 0,38
TbSp (μm)	40,41 + 3,02	47,96 + 4,31	48,52 + 4,65 ^a

Data yang disajikan merupakan rata-rata dan simpangan baku

Data dianalisis dengan one way anova ($p < 0,05$)

HD: *Hard Diet*/diet padat; SD: *Soft Diet*/diet lunak; LD: *Liquid Diet*/diet cair. ^a $P < 0,05$ terhadap HD; ^b $P < 0,05$ terhadap SD. Ketebalan dinding trabekula (TbTh) dan rongga trabekula (TbSp) diukur dari gambaran SEM.

Berdasarkan analisis SEM EDX, nampak bahwa Ca, P, Cr, Ni, Cu dan Fe sebagai logam yang dominan ditemukan dalam tulang korpus mandibula tikus (tabel 1). Diantara ketiga kelompok percobaan ada perbedaan secara kuantitatif. Kalsium merupakan atom dengan komposisi tertinggi dan paling banyak terkandung pada tulang korpus mandibula kelompok HD. Fosfor merupakan atom berikutnya yang paling dominan. Namun berkebalikan dengan Ca yang jumlahnya semakin meningkat seiring meningkatnya konsistensi diet, Atom P persentasenya justru menurun berbanding terbalik dengan kepadatan makanan. Berdasarkan rasio Ca/P nampak bahwa kelompok HD nilainya 1.31 ($\pm 0,08$) lebih tinggi dibanding kelompok SD 1.25 ($\pm 0,15$) dan LD 1.08 ($\pm 0,13$). Meskipun demikian perbedaan yang signifikan hanya terhadap kelompok LD. Selain P, atom yang kandungannya lebih besar pada kelompok LD dibanding kelompok lainnya adalah Cr, Ni dan Cu. Sedangkan Fe merupakan atom yang jumlahnya berbanding lurus dengan meningkatnya kepadatan makanan sebagaimana Ca.

PEMBAHASAN

Penelitian difokuskan pada bioelemen Ca, P, Cr, Fe, Ni, dan Cu, yang kandungannya telah diketahui dapat mempengaruhi metabolisme tulang serta persentasenya paling banyak ditemukan pada tulang mandibula.^{4,13} Kandungan struktur atom tulang dapat dideteksi dengan baik melalui pemeriksaan dengan SEM-EDX. Beberapa penelitian telah menyepakati bahwa metabolisme tulang dapat dipengaruhi oleh unsur mineral atom didalamnya. Kalsium dan fosfor merupakan dua elemen yang paling tinggi persentasenya. Keduanya merupakan kandungan dari hidroksiapatit sebagai komponen utama tulang. Pada kelompok diet padat, kadar Ca yang terkandung paling tinggi, dan sebaliknya kandungan P rendah. Rasio Ca/P sangat penting dan merupakan prediktor yang

lebih baik untuk menilai kualitas tulang.¹⁴ Perbedaan yang signifikan nampak pada rasio Ca/P kelompok LD jika dibandingkan HD sebagai kelompok kontrol. Sedangkan jika dibandingkan terhadap kelompok SD, perbedaannya tidak signifikan. Hal ini menunjukkan diet dengan konsistensi lunak tidak cukup memicu mekanisme seluler dan metabolisme tulang. Analisis kualitatif tulang dengan SEM menunjukkan korelasi yang baik dengan hasil analisis kuantitatifnya. Arsitektur tulang pada kelompok HD tampak paling baik di antara ketiga kelompok. Dinding trabekula cukup tebal dan rongga trabekula kecil sehingga densitas tulangnya nampak padat. Demikian juga dengan kelompok diet cair, gambaran arsitektur tulang dengan rongga trabekula yang melebar menunjukkan adanya korelasi yang kuat dengan rasio Ca/P. Rasio Ca/P dapat digunakan untuk menilai kesehatan tulang dengan lebih baik dibanding konsentrasi Ca atau P secara tunggal.¹⁴

Logam adalah unsur yang umum ditemukan dan dipengaruhi oleh faktor lingkungan, membentuk deposit alami serta digunakan secara luas pada banyak bidang kehidupan. Beberapa logam diperlukan untuk kehidupan dan fungsi organisme, namun ada juga logam yang tidak memainkan peran penting dalam proses fisiologis. Hasil penelitian yang menunjukkan kandungan kromium lebih tinggi pada kelompok LD dibanding kelompok lainnya dapat dihubungkan dengan mikroarsitektur tulang kelompok LD yang secara kualitas tidak sebaik kelompok lain. Kemungkinan adanya efek sitotoksik Cr pada osteoblas yang menyebabkan terjadi reduksi pembentukan tulang. Terjadi penurunan proliferasi, menghambat pelepasan osteokalsin, dan menurunkan aktivitas alkali fosfatase. Efek ini terkait dengan stres oksidatif yang dapat disebabkan oleh rasio OPG/RANKL yang tidak seimbang dan disregulasi ekspresi enzim antioksidan. Oleh karena itu, Cr kadangkala digunakan sebagai komponen preparat untuk mereduksi berat badan karena memberikan

dampak yang mempengaruhi metabolisme tulang.^{15, 16}

Akumulasi nikel yang lebih tinggi pada kelompok LD memberi dampak negatif pada proses struktur tulang, terutama dalam hal ukuran kristal hidroksiapatit. Elemen yang kadarnya lebih tinggi pada kelompok LD lainnya adalah tembaga. Meskipun demikian, oleh karena jaringan tulang mengalami proses remodeling yang konstan, maka hal ini dapat menyebabkan penurunan kandungan tembaga dalam jangka panjang. Selain Ca, besi merupakan elemen di tulang korpus yang terakumulasi lebih besar seiring bertambahnya aktivitas otot pengunyahan pada ketiga kelompok. Aktivitas otot mempengaruhi tingkat serum darah yang didalamnya terkandung besi. Dalam keadaan kelebihan unsur Fe, maka protein hati, heptidine, menghambat penyerapan zat besi dari eritrosit ke dalam sirkulasi dan juga mengurangi pelepasan zat besi dari makrofag. Disebutkan bahwa besi dan tembaga menunjukkan kemampuan untuk terakumulasi dalam bentuk agregat kecil yang terdistribusi secara teratur dan hanya terjadi di tulang.^{8,17}

Efek toksik logam terhadap tulang terutama dengan cara memblokir gugus fungsi penting dalam protein, menggantikan ion yang merupakan kofaktor untuk enzim dan protein fungsional lainnya, serta mengubah struktur spasial protein. Hal ini menyebabkan terganggunya fungsi protein dalam sel, dan pada kasus yang ekstrim dapat menyebabkan kematian. Keberadaan elemen logam dan turunannya dapat masuk ke dalam organisme manusia melalui inhalasi, konsumsi dan sebagai akibat dari penyerapan kulit. Meskipun migrasi logam di dalam tubuh dibatasi oleh adanya penghalang biologis, namun, jika jumlahnya berlebihan, efektivitas penghalang ini terbatas. Jumlah logam yang diserap seringkali tergantung pada pH, kecepatan migrasi melalui sistem pencernaan, serta keberadaan zat lain yang memodifikasi penyerapannya. Komponen utama jaringan tulang yang dapat termineralisasi oleh adanya efek toksik logam adalah hidroksiapatit. Meskipun tulang dan gigi secara kimiawi padat, namun diyakini bahwa elemen logam tertentu dapat terakumulasi di dalamnya dan lebih lanjut dapat menggantikan kalsium dalam struktur hidroksiapatit.¹³

Biologi dan biokimia tulang sangat kompleks dan bergantung pada keseimbangan antara sel, molekul organik, dan konstituen anorganik. Penelitian yang dilakukan oleh Tang s, et.al (2016), menunjukkan bahwa latihan fisik memiliki pengaruh yang signifikan pada keseimbangan elemen. Disebutkan bahwa keringat yang dihasilkan selama latihan fisik dapat secara efektif menghilangkan logam berat beracun dari tubuh dan mengurangi akumulasi jejak logam berat dalam tubuh.

Mereka menyarankan agar latihan fisik dapat dilakukan secara teratur untuk meningkatkan kemampuan detoksifikasi tubuh dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh logam berat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa beban mekanik pengunyahan melalui rangsangan konsistensi diet dapat menjadi rangsangan yang relevan untuk meregulasi metabolisme tulang. Metabolisme tulang nampaknya dapat dipengaruhi juga oleh mineral yang ditemukan di lingkungan sekitar tulang yang bisa memberi pengaruh positif atau justru berdampak negatif.¹⁸ Pengetahuan tentang pengaruh konsistensi diet terhadap kepadatan tulang dapat menjadi acuan di bidang kedokteran gigi antara lain dalam menentukan penyangga dalam pembuatan gigi tiruan ataupun pertimbangan dalam pemasangan implan gigi. Pengamatan pada regio molar dalam penelitian ini, juga dapat menjadi acuan untuk menentukan kekuatan penjangkar dalam pergerakan ortodontik gigi oleh karena gigi yang sering berperan sebagai penjangkar adalah gigi posterior. Identifikasi mikroarsitektur dan keberadaan logam pada struktur tulang korpus tikus membuka perspektif baru tentang kemungkinan patogenesis penyebab menurunnya kualitas tulang. Deteksi kontaminasi logam berat kedalam tulang atau jaringan lain, dapat dipertimbangkan untuk menjadi metode yang dapat memperkuat dalam menilai status tulang.

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan aktivitas otot pengunyahan yang disebabkan oleh konsistensi diet yang lebih padat menyebabkan kualitas arsitektur tulang korpus mandibula yang lebih baik dan berkorelasi dengan sifat dan jumlah atom mineral. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut baik in vivo maupun in vitro untuk dapat menjelaskan dampak aktivitas fisik terutama beban mastikasi otot pengunyahan terhadap mekanisme molekuler dari elemen mineral yang mempengaruhi kualitas tulang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kufley S, Scott JE, Ramirez-Yanez G. The effect of the physical consistency of the diet on the bone quality of the mandibular condyle in rats. *Arch Oral Biol.* 2017;77: 23-6.
2. Guerreiro FS, Diniz P, Carvalho PEG, Ferreira EC, Avancini SRP, Ferreira-Santos RI. Effects of masticatory hypofunction on mandibular morphology, mineral density and basal bone area. *Braz J Oral Sci.* 2013;12(3): 205-11.
3. Enomoto A, Watahiki J, Yamaguchi T, Taroulrie, Tachikawa T, Maki K. Effects of mastication on mandibular growth evaluated by microcomputed

- tomography. *European Journal of Orthodontics*. 2010;32: 66–70.
4. Silviana NM, Andarini S, Lyrawati D, Hidayat M. The microarshitecture and atomic mineral composition of the rat's mandibular condyle varying masticatory functional load. *J Int Dent Med Res*. 2020; 13(2): 463-8.
 5. Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behzad M, Behfar A, Sadeghi F, Saadatmand S. The relationship between bone health and plasma zinc, copper lead and cadmium concentration in osteoporotic women. *J Environ Health Sci Eng*. 2014;12:125.
 6. Tsai TL, Pan WH, Chung YT, Wu TN, Tseng YC, Liou SH, Wang SL. Association between urinary lead and bone health in a general population from Taiwan. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2015;Jul:8.
 7. Soudani N, Ibtissem Ben A, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats. *Toxicol Ind Health*. 2011; 27:724–34.
 8. Dermience M, Lognay G, Mathieu F, Goyens P. Effects of thirty elements on bone metabolism. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;32:86–106.
 9. Q.Yang J, Jian SB, Abramson X, Huang. Inhibitory effects of iron on bonemorphogenetic protein 2–induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2011;26: 1188–96.
 10. Kurniawan PA, Satrio R. Laporan Kasus: Kegoyangan Gigi Pada Pasien disertai Diabetes Mellitus (A Case Report: *Tooth Unsteadiness in Patients with Diabetes Mellitus*). *Stomatognatic (J.K.G Unej)*. 2020; 17(2):46-9.
 11. Brodziak-Dopierała B, Kwapuliński J, Sobczyk K, Kowol J. The occurrence of nickel and other elements in tissues of the hip joint. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011; 74(4): 630-5.
 12. Amin MN, Permatasari N. Aspek Biologis Pergerakan Gigi secara Ortodonsi (*The Biologic Aspect of Orthodontic Tooth Movement*). *Stomatognatic (J.K.G Unej)*. 2016;13(1):22-7.
 13. Bryła E, Dobrzyński M, Konkol D, Kuropka P, Styczyńska M, Korczyński M. Toxic Metals Content in Impacted Third Molars and Adjacent Bone Tissue in Different Groups of Patients. *Materials*. 2021;14(4):793.
 14. Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J. Preliminary estimates of the calcium/phosphorus ratio at different cortical bone sites using synchrotron microCT. *Phys Med Biol*. 2006;51(7): 1849-55.
 15. W.P. Zijlstra, S.K. Bulstra, J.J.A.M. van Raay, B.M. van Leeuwen, R. Kuijjer, Cobalt and chromium ions reduce human osteoblast-like cell activity invitro, reduce the OPG to RANKL ratio, and induce oxidative stress. *J. Orthop.Res*. 2012;30:740–7.
 16. Yazaki, Y.; Faridi, Z.; Ma, Y.; Ali, A.; Northrup, V.; Njike, V.Y.; Liberti, L.; Katz, D.L. A pilot study of chromium picolinate for weight loss. *J. Altern. Complement. Med*. 2010, 16, 291–99.
 17. Maciejewska K, Drzazga Z, Kaszuba M. Role of trace elements (Zn, Sr, Fe) in bone development: Energy dispersive X-Ray fluorescence study of rat bone and tooth tissue. *Biofactors*. 2014;40:425–35.
 18. Tang S, Xinzhe-Yu, Cinan-Wu. Comparison of the levels of five heavy metals in human urine and sweat after strenuous exercise by ICP-MS. *j. appl. math. Phys*. 2016;4(2):183-8