

## SUPLEMENTASI ASAM FOLAT PRAKONSEPSI DALAM PENCEGAHAN BIBIR SUMBING : EVIDENCE - BASED CASE REPORT

Amelia Jessica<sup>1</sup>, Nurul Ratna Mutu Manikam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Gizi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, <sup>2</sup>RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia

Corresponding : Amelia Jessica, Departemen Gizi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, <sup>2</sup>RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia, Email [ameliakusnandi@gmail.com](mailto:ameliakusnandi@gmail.com)

### Abstract

Cleft lip is a congenital abnormality that is often found in newborns, especially in developing countries. Risk factors include exposure to cigarettes and chemicals, alcohol consumption, and inadequate intake of micronutrients during pregnancy. Higher doses of folic acid supplementation in the preconception period were associated with a reduced risk of cleft lip. Objective: To determine the relationship between preconception folic acid supplementation with the risk of cleft lip. Methods: The literature search was carried out by advanced searching on Pubmed, Cochrane Library, Scopus, and ProQuest with the eligibility criteria determined by the author. Results: A systematic review-meta-analysis study by Jayarajan, et al. (2019) explained that there was a strong relationship between high-dose folic acid supplementation and cleft lip. A case-control study that assessed the association of preconception folic acid supplementation with a reduced risk of cleft lip was conducted by 2 investigators. Xu W, et al. (2021) explained that preconception folic acid supplementation reduced the risk of cleft lip (aOR = 0.52, 95% CI 0.30-0.90), while Mendonca VJ, et al. (2019) explained that to get side effects in 1 patient, 71 patients needed folic acid supplementation for 1 year. Conclusion: Based on two studies, it was found that preconception folic acid supplementation can reduce the risk of cleft lip, but further research is needed.

**Key words:** cleft lip, folic acid supplementation, preconception

### Abstrak

Bibir sumbing merupakan kelainan bawaan yang sering dijumpai pada bayi baru lahir, terutama di negara berkembang. Faktor risikonya antara lain paparan terhadap rokok dan bahan kimia, konsumsi alkohol, serta asupan mikronutrien yang tidak memadai selama kehamilan. Dosis suplementasi asam folat yang lebih tinggi pada masa prakonsepsi berhubungan dengan penurunan risiko bibir sumbing. Tujuan: Mengetahui hubungan antara suplementasi asam folat prakonsepsi dengan risiko terjadinya bibir sumbing. Metode: Pencarian literatur dilakukan dengan *advanced searching* pada Pubmed, Cochrane Library, Scopus, dan ProQuest dengan kriteria eligibilitas yang ditentukan oleh penulis. Hasil: Studi *systematic review*-meta analisis oleh Jayarajan, *et al.* (2019) menjelaskan bahwa terdapat hubungan kuat antara suplementasi asam folat dosis tinggi dengan bibir sumbing. Studi kasus-kontrol yang menilai hubungan suplementasi asam folat prakonsepsi dengan penurunan risiko bibir sumbing dilakukan oleh 2 peneliti. Penelitian Xu W, *et al.* (2021) menjelaskan bahwa suplementasi asam folat prakonsepsi menurunkan risiko bibir sumbing (aOR = 0,52, 95% CI 0,30-0,90), sedangkan penelitian Mendonca VJ, *et al.* (2019) menjelaskan bahwa untuk mendapatkan efek samping pada 1 pasien diperlukan 71 pasien dengan suplementasi asam folat selama 1 tahun. Kesimpulan: Berdasarkan dua penelitian didapatkan hasil bahwa suplementasi asam folat prakonsepsi dapat menurunkan risiko bibir sumbing, namun diperlukan penelitian lebih lanjut.

**Kata kunci :** bibir sumbing, suplementasi asam folat, prakonsepsi

### Pendahuluan

Bibir sumbing merupakan kondisi malformasi kraniofasial tersering yang terjadi pada bayi baru lahir. Terdapat tiga tipe

bibir sumbing, yaitu hanya celah bibir (*labioschisis*), celah bibir disertai celah langit-langit (*labiopalatoschisis*), dan hanya celah langit-langit (*palatoschisis*).<sup>1,2</sup> Kondisi

ini merupakan kelainan bawaan yang terjadi sejak embrio berusia empat minggu, yang mengenai bibir sampai dengan langit-langit mulut.<sup>3</sup> Penyebabnya multifaktorial, di antaranya interaksi faktor genetik dan lingkungan, seperti ibu merokok, konsumsi alkohol, paparan bahan kimia selama kehamilan, serta asupan mikronutrien yang tidak memadai.<sup>1,4-6</sup> Beberapa mikronutrien yang berperan penting dalam etiologi bibir sumbing antaranya lain asam folat, vitamin B6, dan vitamin B12.<sup>4</sup> Berdasarkan penelitian Loho JN<sup>3</sup> di Manado pada Januari 2011 – Oktober 2012, didapatkan prevalensi sebesar 57% dengan etiologi berupa faktor genetik sebesar 25%, faktor lingkungan 62%, dan faktor tidak diketahui sebesar 13%. Studi Salari, et al.<sup>7</sup> mengatakan bahwa prevalensi bibir sumbing sekitar 0,3-0,45 per 1000 kelahiran hidup.

Seperti telah disebutkan di atas bahwa insidensi bibir sumbing berhubungan dengan asupan asam folat maternal, risikonya meningkat empat kali lipat pada ibu yang tidak mengonsumsi asam folat selama tiga bulan pertama kehamilan.<sup>8,9</sup> Sebelumnya telah diketahui bahwa kekurangan asam folat selama awal kehamilan dapat menyebabkan defek tabung saraf, seperti spina bifida.<sup>8-10</sup> Terdapat bukti kuat bahwa asupan asam folat prakonsepsi dapat mencegah defek tabung saraf, tetapi belum diketahui efeknya pada bibir sumbing.<sup>9</sup> Pada studi meta-analisis,

model hewan, dan studi in vitro menunjukkan terdapat efek protektif asam folat terhadap bibir sumbing, namun masih diperlukan penelitian lanjutan mengenai dosis dan metode pemberian.<sup>11</sup> Hubungan suplementasi asam folat pada masa prakonsepsi dalam pencegahan bibir sumbing belum diketahui secara pasti, oleh sebab itu penulis ingin lebih mendalami topik ini melalui *Evidence-Based Case Report* (EBCR).

## Kasus Pasien

Ny. R, 41 tahun, dirawat di RSAB Harapan Kita dengan diagnosis G7P6(AH5)A0 hamil 37 minggu 1 hari dengan janin kelainan anomali multipel dengan hipoperfusi. Pasien lupa kapan hari pertama haid terakhir (HPHT). Pasien mengaku rutin memeriksakan kehamilan di bidan dan rumah sakit terdekat. Selama kehamilan, pasien sering diberikan obat, namun tidak ingat namanya karena tidak rutin diminum. Pada pasien dilakukan operasi sesar, dilahirkan bayi laki-laki, dengan nilai APGAR 6/9 dan cairan ketuban ibu jernih. Bayi diketahui dengan kelainan kongenital multipel (mikrosefali, *labiognatopalatoschisis*, polidaktili, omfalokel, mikropenis, *rocker bottom feet*, *clunched fingers*) serta hidronefrosis bilateral. Berat badan lahir (BBL) 2675 gram, panjang badan (PB) 46 cm, lingkar kepala (LK) 31,5 cm, lingkar dada (LD) 30 cm, lingkar perut tidak dilakukan pemeriksaan,

dan lingkaran lengan (LiLA) 11 cm. Dokter sudah menjelaskan kondisi anak kepada orangtua dan diputuskan *do not resuscitate* (DNR). Anak keempat pasien juga menderita bibir sumbing dan sudah meninggal saat berusia 3 hari.

Sejak sebelum hamil, pasien makan besar sebanyak 3 kali sehari dengan selingan sebanyak 1 kali berupa gorengan. Makan besar biasanya berupa nasi ½ gelas dengan lauk tahu goreng 1 biji besar atau tempe goreng 2 potong sedang. Dari analisis asupan didapatkan pasien hanya mengonsumsi sayuran hijau berupa kangkung sebanyak ½ mangkuk setiap hari. Pasien jarang mengonsumsi buah, biasanya pisang sebanyak 1 buah per minggu. Pasien tidak suka kacang-kacangan. Pasien tidak rutin mengonsumsi suplementasi asam folat yang diberikan oleh dokter kandungan.

## Material dan Metode

Pencarian literatur dilakukan dengan *advanced searching* pada Pubmed, Cochrane Library, Scopus, dan ProQuest pada tanggal 16 Desember 2021. Digunakan *MesH Term* dan *Title/Abstract* dalam pencarian. Kata kunci yang digunakan adalah “Maternal”, “Preconceptional”, “Periconceptional”, “Folic Acid”, “Folic Acid Intake”, “Folic Acid Supplementation”, “Oral Cleft”, dan “Orofacial Cleft”. Kriteria inklusi adalah pasien perempuan dewasa yang sedang hamil sebagai subjek penelitian, desain penelitian

*systematic review* meta-analisis, kohort, atau kasus-kontrol, publikasi penelitian dalam kurun waktu 5 tahun terakhir, dan penelitian dipublikasi dalam bahasa Inggris. Sedangkan kriteria eksklusi adalah artikel publikasi yang tidak dapat diakses secara *fulltext*.

## Hasil Penelitian

Studi ini mendapatkan 2060 literatur dari Pubmed, 1 literatur dari Cochrane, 14 literatur dari Scopus, dan 439 literatur dari ProQuest. Studi ini melakukan seleksi literatur berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi, didapatkan 3 literatur dengan teks lengkap dan sesuai kriteria eligibilitas. Tiga literatur tersebut berupa satu literatur *systematic review* meta-analisis dan dua literatur kasus-kontrol. Ketiga literatur tersebut memiliki tujuan serupa dengan pertanyaan klinis studi ini, yaitu “Apakah suplementasi asam folat prakonsepsi dapat mencegah bibir sumbing pada janin yang dikandung?”. Artikel terpilih dilakukan telaah kritis, meliputi aspek validitas penelitian, kepentingan klinis (*importancy*) hasil, dan aplikabilitasnya atau relevansinya terhadap masalah klinis yang ada, serta dilakukan penentuan derajat kekuatan bukti atau *level of evidence*.

## Diskusi

Insidensi bibir sumbing banyak ditemukan di negara berkembang. Seperti di Indonesia, anak lahir hidup cukup sering

ditemukan dengan bibir sumbing, yaitu sebesar 50,53%. Penyebabnya multifaktorial, namun dikatakan memiliki hubungan erat dengan asam folat, baik dari bahan makanan sumber maupun suplementasi. Obat yang mengganggu metabolisme folat (misal fenitoin) diketahui memiliki efek teratogenik, seperti bibir sumbing, retardasi pertumbuhan, defek ekstremitas, dan deformitas kraniofasial lain.<sup>12</sup>

Folat berperan sebagai ko-enzim, baik akseptor maupun donor, dari 1 unit karbon dalam reaksi biokimia yang melibatkan metabolisme asam amino. Dalam sintesis purin dan pirimidin yang merupakan komponen DNA dan RNA, folat memiliki peran penting. Hal ini berhubungan dengan regulasi ekspresi gen dan diferensiasi sel. Sintesis DNA dalam jumlah banyak dibutuhkan dalam proses proliferasi jaringan yang cepat. Defisiensi folat akan terlihat pertama kali dalam sistem hematopoetik yang mengakibatkan anemia, permukaan sel epitel, dan gonad. Selain itu, juga dapat dilihat dari peningkatan homosistein sebagai akibat dari kegagalan remetilasi oleh enzim yang terikat folat. Peningkatan level homosistein berhubungan dengan peningkatan risiko kelainan kongenital, terutama *neural tube defects* dan bibir sumbing. Keduanya dikaitkan dengan sel *neural crest* yang berperan dalam penutupan *neural tube* dan pada perkembangan struktur

oral. *Neural walls fuse* terjadi pada 21-22 hari setelah konsepsi, penutupan *cranial neural pore* terjadi pada hari ke-24, dan *caudal neural pore* terjadi pada hari ke-26. Daerah mesenkim wajah merupakan derivat dari *neural crest*, sehingga suplementasi asam folat prakonsepsi dapat mengurangi risiko terjadinya bibir sumbing.<sup>12</sup> Namun, sampai saat ini masih dilakukan penelitian untuk mencari dosis suplementasi asam folat yang sesuai, terutama yang diberikan pada periode prakonsepsi dan saat awal kehamilan (trimester pertama), untuk mencegah terjadinya bibir sumbing semua tipe.

Jayarajan R, et al.<sup>6</sup> melakukan penelitian *systematic review* dari 4 studi (1 *randomized control trial*, 2 *prospective case-control trials*, dan 1 *single case-control surveillance*). Seluruh studi ini menilai suplementasi asam folat prakonsepsi dikaitkan dengan penurunan insiden bibir sumbing. Keseluruhan studi melibatkan 9513 partisipan dari Brazil, Prague, New Jersey, dan Hungaria. Penelitian tersebut mengumpulkan data penelitian yang telah dilakukan sejak 1958 sampai dengan 2009 melalui 4 *database* besar, yaitu Medline, Cochrane, Embase, dan Lilacs. Dari empat studi yang digunakan pada penelitian ini, didapatkan dosis asam folat prakonsepsi yang bervariasi untuk kelompok kasus. Penelitian Wehby GL, et al.<sup>13</sup> pada tahun 2004-2009, kelompok kasus diberikan suplementasi asam

folat sebesar 4 mg, sedangkan kelompok kontrol diberikan asam folat sebesar 0,4 mg. Suplementasi tersebut diberikan sejak saat prakonsepsi sampai dengan trimester pertama. Dari hasil penelitian, didapatkan bahwa rekurensi bibir sumbing pada kelompok kontrol lebih besar daripada kelompok kasus (2,9% vs 0,8%) dengan pengecualian pada kasus *palatoschisis*. Insidensi *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* dan *palatoschisis* juga ditemukan bahwa rekurensinya lebih tinggi pada kelompok kontrol (2,9%) dibandingkan dengan kelompok kasus (1,6%). Hasil ini tidak menunjukkan rasio rekurensi yang berbeda bermakna.

Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Tolarova M dan Briggs RM. Tolarova M dan Harris J<sup>14</sup> melakukan penelitian pada tahun 1976-1992 mengenai suplementasi asam folat selama 2 bulan prakonsepsi dilanjutkan 3 bulan kemudian. Kelompok kasus diberikan suplementasi asam folat sebesar 10 mg, sedangkan kelompok kontrol diberikan suplementasi asam folat yang tidak diketahui dosisnya. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa terjadi penurunan risiko rekurensi *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* sebesar 65% pada kelompok kasus. Briggs RM<sup>15</sup> melakukan penelitian pada tahun 1958-1976 mengenai suplementasi asam folat prakonsepsi yang diteruskan sampai dengan

usia kehamilan 5 bulan. Kelompok kasus mendapat dosis 5 mg, sedangkan kelompok kontrol tidak diketahui dosisnya. Penelitian tersebut memberikan hasil rasio insidensi *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* maupun *palatoschisis* lebih rendah daripada kontrol (3,1% vs 4,8%). Dari ketiga penelitian tersebut tidak didapatkan adanya efek samping.

Penelitian *The Hungarian Case-Control Surveillance of Congenital Abnormalities* mengenai asam folat prakonsepsi yang diberikan sebesar 0,8 mg tidak memberikan efek proteksi. Sedangkan suplementasi asam folat sebanyak 6 mg, yang diberikan pada saat periode kritis (trimester pertama dan kedua), memberikan efek proteksi terhadap *labiopalatoschisis*. Insidensinya sebesar 12,4% untuk kelompok kontrol dan 91% pada kelompok kasus. Pada kasus *palatoschisis*, suplementasi asam folat 4 bulan pertama juga memberikan efek proteksi, dengan insidensi sebesar 39% pada kelompok kontrol dan 32,2% pada kelompok kasus.<sup>16</sup> Hal ini sesuai dengan teori mengenai jalur folat yang memberikan kontribusi berupa elemen penting yang diperlukan untuk proses penting dalam sel, seperti sintesis dan proliferasi DNA.<sup>17</sup> Di dalam sel, folat diubah menjadi dihidrofolat, kemudian direduksi menjadi tetrahidrofolat oleh enzim dihidrofolat reduktase. Tetrahidrofolat adalah prekursor untuk sintesis timidin dan purin,

serta S-adenosil-L-metionin (SAM). Timidin dan purin penting untuk sintesis dan perbaikan DNA/RNA, sehingga inhibisi metabolisme folat dapat mempengaruhi pertumbuhan embrio. SAM mentransfer gugus metil ke substrat seperti nukleotida, protein, dan lipid, sehingga reduksinya berdampak besar pada perubahan epigenetik seperti DNA dan metilasi histon yang terjadi selama perkembangan embrio.<sup>18-22</sup>

Pada penelitian Jayarajan R, et al.<sup>6</sup>, kami menemukan kekurangan pada bagian hasil dan diskusi. Dari keempat studi yang digunakan, tidak dilakukan pembahasan lebih lanjut mengenai hasil yang didapat, sehingga data yang ditampilkan terasa kurang lengkap. Selain itu tidak ditampilkan heterogenitas dan *forest plot*, serta *funnel plot* untuk dinilai bias publikasi dan *standard error* penelitian.

Xu W, et al.<sup>10</sup> melakukan penelitian terhadap anak tunggal hidup yang dilahirkan sekitar Oktober 2010 sampai September 2015 di Chengdu, China. Penelitian ini meneliti subjek sebanyak 807 anak dengan bibir sumbing dan 8070 anak sehat. Data diambil dari setiap ibu hamil yang memeriksakan kandungan sebanyak 5 kali selama kehamilan dan 3 kali postpartum (hari ke-7, 28, dan 42). Data mengenai pemeriksaan selama kunjungan, faktor risiko (penyakit ibu, riwayat keluarga, dan kondisi medis lain), serta keluaran kehamilan

(abortus spontan, lahir mati, lahir hidup, cacat bawaan) dicatat oleh dokter spesialis obgyn dan perawat. Ibu hamil yang rutin mengonsumsi asam folat 400 µg/hari selama periode perikonsepsi setidaknya 1 bulan disebutkan sebagai “pengguna perikonsepsi”. Ibu hamil yang memulai suplementasi asam folat sebelum hari haid terakhir disebut sebagai “pengguna prakonsepsi”, sedangkan yang memulai setelah hari haid terakhir disebut sebagai “pengguna postkonsepsi”. Ibu hamil yang tidak mengonsumsi asam folat atau mengonsumsi asam folat kurang dari 1 bulan disebut sebagai “bukan pengguna”. Perbedaan karakteristik ibu dan anak pada kelompok kasus dan kontrol dianalisis menggunakan tes *Pearson chi-square*.

Pada subjek bukan pengguna, paling banyak ditemukan pada kelompok *labioschisis* (21%), *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* (20,6%), dan *labiopalatoschisis* (20,3%). Pada subjek pengguna perikonsepsi, paling banyak ditemukan pada kelompok kontrol (90,8%) disusul dengan *palatoschisis* (87,5%). Pada subjek pengguna prakonsepsi, paling banyak ditemukan pada kelompok *labioschisis* (24,7%), kelompok kontrol (23,7%), dan kelompok *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* (21,3%). Pada subjek pengguna postkonsepsi, paling banyak ditemukan pada kelompok *palatoschisis* (70,2%), kelompok kontrol (67,1%), dan *labiopalatoschisis*



(60,7%). Hasil ini ditemukan pada hubungan suplementasi asam folat prakonsepsi pada kelompok kasus dan kontrol. Sedangkan hubungan suplementasi asam folat perikonsepsi dengan bibir sumbing memberikan hasil sebagai berikut. Insidensi *labio* dengan/tanpa *palatoschisis* paling banyak ditemukan pada kelompok pengguna prakonsepsi (aOR 0,43, 95% CI 0,33-0,56), sedangkan pada kelompok pengguna perikonsepsi dan postkonsepsi memberikan hasil serupa. Insidensi *labioschisis* paling banyak ditemukan pada kelompok prakonsepsi (aOR 0,51, 95% CI 0,34-0,75) dan paling sedikit ditemukan pada kelompok postkonsepsi (aOR 0,39, 95% CI 0,28-0,55). Insidensi *labiopalatoschisis* paling sedikit ditemukan pada kelompok pengguna prakonsepsi (aOR 0,38, 95% CI 0,27-0,54) dan pada kelompok pengguna perikonsepsi dan postkonsepsi insidensinya serupa. Pada ketiga kelompok tersebut hasilnya bermakna secara signifikan, sedangkan pada kelompok *palatoschisis* hasil yang bermakna hanya terlihat pada kelompok pengguna prakonsepsi (aOR 0,52, 95% CI 0,30-0,90).<sup>10</sup>

Penelitian Mendonca VJ<sup>5</sup> menggunakan kuesioner untuk mengumpulkan data suplementasi prenatal, asupan folat dari sumber bahan makanan, dan faktor yang berpotensi sebagai perancu. Analisis regresi logistik dilakukan pada data dari kelompok kasus dan kontrol untuk

melihat hubungan antara suplementasi asam folat dan bibir sumbing semua tipe, serta menganalisis secara terpisah untuk *labioschisis* dan/atau *palatoschisis* dan *palatoschisis*, disesuaikan dengan variabel yang bermakna secara signifikan. Suplementasi asam folat tunggal sebanyak 0,4 mg selama setidaknya 3 dari 4 bulan periode perikonsepsi memiliki peran protektif terhadap semua tipe bibir sumbing. Kadar folat makanan yang lebih tinggi ditemukan berkaitan dengan penurunan risiko semua tipe bibir sumbing. Kekurangan dari penelitian ini adalah pengumpulan data hanya 3 bulan, sejak Oktober sampai Desember 2017.

Asam folat banyak terdapat pada sayuran hijau, kacang-kacangan, serta buah. Beberapa contoh sumber bahan makanan beserta kandungan asam folat per 100 g diuraikan sebagai berikut, yaitu edamame (311 mcg), lentil (181 mcg), asparagus (149 mcg), bayam (146 mcg), selada (136 mcg), brokoli (108 mcg), alpukat (81 mcg), mangga (43 mcg), jagung manis (42 mcg), dan jeruk (30 mcg). Selain itu asam folat dapat difortifikasikan ke dalam makanan seperti sereal, spageti, ataupun bagel.<sup>23</sup> Sedangkan untuk suplementasi, terdapat 2 macam sediaan yang beredar di Indonesia, yaitu suplementasi asam folat saja dan suplementasi asam folat kombinasi dengan mikronutrien lain.

## Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan telaah kritis dari ketiga penelitian tersebut, diperlukan studi longitudinal dengan durasi waktu yang lebih lama, subjek penelitian berskala besar, dengan etnis yang beragam, serta melibatkan faktor-faktor lain yang berpotensi sebagai komponen perancu seperti usia, indeks massa tubuh, paritas, medikasi selama kehamilan (terutama trimester pertama), paparan terhadap pestisida dan rokok, riwayat konsumsi alkohol, riwayat keluarga dengan bibir sumbing, dan asupan makan.

## Daftar Pustaka

1. Farronato G, Cannalire P, Martinelli G, Tubertini I, Giannini L, Galbiati G, et al. Cleft lip and/or palate: review. *Minerva Stomatol.* 2014;63(4):111-26.
2. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009;374(9703):1773-85.
3. Loho J. Prevalensi Labioschisis di RSUP. Prof. Dr. R. D. Kandou Manado Periode Januari 2011 – Oktober 2012. *e-Biomedik (eBM).* 2013;1:396-401.
4. Oner D, Taştan H. Cleft lip and palate: Epidemiology and etiology. *Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2020;5.
5. Mendonca VJ. Maternal Folic Acid Intake and Risk of Nonsyndromic Orofacial Clefts: A Hospital-Based Case-Control Study in Bangalore, India. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020;57(6):678-86.
6. Jayarajan R, Natarajan A, Nagamuttu R. Efficacy of Periconceptional High-Dose Folic Acid in Isolated Orofacial Cleft Prevention: A Systematic Review. *Indian J Plast Surg.* 2019;52(2):153-9.
7. Salari N, Darvishi N, Heydari M, Bokae S, Darvishi F, Mohammadi M. Global prevalence of cleft palate, cleft lip and cleft palate and lip: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2021.
8. Houston M. Taking folic acid at start of pregnancy seems to lower risk of cleft lip and palate. *BMJ : British Medical Journal.* 2012;345:e4614.
9. Kelly D, O'Dowd T, Reulbach U. Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. *Br J Gen Pract.* 2012;62(600):e466-72.
10. Xu W, Ling Y, Deng C, Zhao Z, Longrong R, Ren Z, et al. Maternal periconceptional folic acid supplementation reduced risks of non-syndromic oral clefts in offspring. *Scientific Reports (Nature Publisher Group).* 2021;11(1).
11. Bendahan ZC, Escobar LM, Castellanos JE, González-Carrera MC. Effect of folic acid on animal models, cell cultures, and human oral clefts: a literature review. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2020;21(1):62.
12. T. Hartridge, H. M. Illing & J. R. Sandy. The Role of Folic Acid in Oral Clefting, *British Journal of Orthodontics,* 2014; 26:2, 115-120.
13. Wehby GL, Félix TM, Goco N, Richieri-Costa A, Chakraborty H, Souza J, et al. High dosage folic acid supplementation, oral cleft recurrence and fetal growth. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(2):590-605.
14. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology.* 1995;51(2):71-8.
15. Ács N, Mátrai Á, Kaposi A. First data from the new, unified database of the Hungarian case-control surveillance of congenital abnormalities. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;34(17):2887-92.
16. Lucock M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2000;71(1):121-38.
17. Beaudin AE, Stover PJ. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a minireview. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85(4):274-84.
18. Momb J, Lewandowski JP, Bryant JD, Fitch R, Surman DR, Vokes SA, et al. Deletion of *Mthfd11* causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(2):549.



19. Sun S, Gui Y, Jiang Q, Song H. Dihydrofolate reductase is required for the development of heart and outflow tract in zebrafish. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2011;43(12):957-69.
20. Tang LS, Santillano DR, Wlodarczyk BJ, Miranda RC, Finnell RH. Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005;135c(1):48-58.
21. Wang X, Wang J, Guan T, Xiang Q, Wang M, Guan Z, et al. Role of methotrexate exposure in apoptosis and proliferation during early neurulation. *J Appl Toxicol*. 2014;34(8):862-9.
22. Byrd-Bredbenner C, Moe G, Berning J, Kelley D. *Wardlaw's Perspectives in Nutrition a Functional Approach Second Edition*. Second. New York: McGraw- Hill Education.; 2019.