

Kode/ NamaRumpunIlmu: 331/ IlmuKedokteran Gigi

EXECUTIVE SUMMARY
PENELITIAN DOSEN PEMULA



**EKSPRESI MATRIKS METALLOPROTEINASE-8 PADA PULPA GIGI
SETELAH APLIKASI BAHAN ETSA *ETHYLENE DIAMINE*
TETRAACETIC ACID 19% DAN ASAM FOSFAT 37%**

(Kajian *in vivo* pada gigi molar tikus *Sprague Dawley*)

Peneliti

drg. Nadie Fatimatuzzahro 0024048203

**Dibiayai oleh
DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2013
No. DIPA-023.04.2.414995/2013**

**UNIVERSITAS JEMBER
DESEMBER, 2013**

EXECUTIVE SUMMARY

Judul : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-8 pada Pulpa Gigi setelah Aplikasi Bahan Etsa Ethylene Diamine Tetraacetic Acid 19% dan Asam Fosfat 37% (Kajian in vivo pada gigi molar tikus *Spague Dawley*)

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : drg. Nadie Fatimatuzzahro

NIDN : 0024048203

Sumber Dana : DIPA Universitas Jember

Diseminasi : belum ada

Alamat surel (e-mail) : nadiefatima@gmail.com

Perguruan Tinggi : Universitas Jember

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Jember, 20 Desember 2013
Ketua,

drg. Nadie Fatimatuzzahro
NIP. 198204242008012022

**EKSPRESI MATRIKS METALLOPROTEINASE-8 PADA PULPA GIGI
SETELAH APLIKASI BAHAN ETSA *ETHYLENE DIAMINE
TETRAACETIC ACID* 19% DAN ASAM FOSFAT 37%**

(Kajian *in vivo* pada gigi molar tikus *Sprague Dawley*)

Nadie Fatimatuzzahro

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Intisari

Penggunaan bahan etsa seperti *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) dan asam fosfat pada sistem restorasi adhesif bertujuan untuk membuat retensi bagi bahan restorasi, dapat menginduksi inflamasi pada pulpa. Matriks metalloproteinase-8 (MMP-8) merupakan enzim kolagenolitik yang mampu mendegradasi kolagen tipe 1. Pada kondisi normal terdapat ekspresi MMP-8 dalam kadar rendah dan meningkat pada proses inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek EDTA 19% dan asam fosfat 37% sebagai bahan etsa terhadap respon inflamasi dan ekspresi MMP-8 pada pulpa gigi.

Empat puluh delapan ekor tikus *Sprague Dawley* jantan digunakan dalam penelitian ini. Gigi molar satu rahang atas dipreparasi pada permukaan oklusal. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok. EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades diaplikasikan pada kavitas kelompok I, II dan III. Dekapitasi hewan coba dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, 7 dan 14 setelah perlakuan. Spesimen didekalsifikasi menggunakan EDTA 10%, ditanam pada parafin dan dipotong serial. Pengecatan hematoksilin eosin dilakukan untuk mengetahui respon inflamasi. Imunohistokimia dilakukan dengan *rabbit anti rat MMP-8 polyclonal antibody* untuk melihat ekspresi MMP-8.

Hasil Anava menunjukkan perbedaan yang bermakna jumlah sel inflamasi antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa aplikasi bahan etsa menyebabkan infiltrasi sel inflamasi. Hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi lebih banyak dibanding EDTA 19% ($p < 0,05$). Pada hari ke-1 dan 7 setelah perlakuan, asam fosfat 37% menunjukkan ekspresi MMP-8 yang lebih kuat dibanding EDTA 19%. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi yang lebih banyak dan ekspresi MMP-8 yang lebih kuat dibanding EDTA 19%. Meskipun EDTA 19% dan asam fosfat 37% menyebabkan inflamasi, namun kondisi pulpa tampak normal pada hari ke-14 setelah perlakuan.

Kata kunci: EDTA, asam fosfat, MMP-8, inflamasi, pulpa

Abstract

Etching agents such as ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and phosphoric acid which are widely used in adhesive restoration system aimed to made for retention of restorative materials; however, these agents may induce inflammation of dental pulp. Matrix metalloproteinase-8, the major collagenolytic enzyme, degrades collagen type 1. This enzyme is expressed in low level in normal condition, however, the expression will increase during inflammation. The purpose of the present research was to study the effect of 19% EDTA and 37% phosphoric acid application as an etching agents on the inflammatory response and MMP-8 expression of dental pulp.

Forty-eight male Sprague Dawley rats were used in this study. Cavity preparation was made on the occlusal surface of maxillary first molar. The rats were divided into 3 groups. 19% EDTA, 37% phosphoric acid, and distilled water were applied on the surface of the cavity of the teeth in group I, II, and III subsequently. The rats were sacrificed at 1, 3, 5, 7, and 14 days after the treatment. The specimens were decalcified using 10% EDTA, embedded in paraffin, and sectioned serially. The sections were stained with hematoxylin eosin to examine the inflammatory response. Immunohistochemistry was performed using rabbit anti rat MMP-8 polyclonal antibody to examine MMP-8 expression.

Anova showed a significant difference among groups ($p < 0.05$), indicating that etching agents application induced inflammatory cells infiltration in dental pulp. Tuckey HSD test showed that application of 37% phosphoric acid increased higher number of inflammatory cells than 19% EDTA ($p < 0.05$). 37% phosphoric acid application stimulated stronger MMP-8 expression than 19% EDTA on 1 and 7 days after the treatment. In conclusion, 37% phosphoric acid induced higher number of the inflammatory cells and stronger expression of MMP-8 than 19% EDTA. Although application of 19% EDTA and 37% phosphoric acid as an etching agents induced inflammation, the pulp showed normal condition on 14 days after the application.

Keywords: 19% EDTA, 37% phosphoric acid, MMP-8, inflammation, dental pulp

Pendahuluan

Karies adalah penyakit infeksi mikroba pada gigi yang menyebabkan terurai dan rusaknya jaringan keras gigi. Destruksi gigi oleh karena karies atau faktor lain, membutuhkan restorasi untuk menggantikan substansi gigi yang hilang sehingga akan mengembalikan bentuk, fungsi dan estetika.¹ Restorasi adhesif menggunakan resin komposit digunakan oleh para dokter gigi karena memiliki estetik yang baik. Desain preparasi kavitas untuk bahan restorasi adhesif tidak memerlukan pembuatan retensi seperti *undercut*, sehingga meminimalkan pembuangan jaringan dan mengurangi terbukanya tubulus dentin.²

Penggunaan asam sebagai dentin kondisioner atau bahan etsa pada sistem restorasi adhesif bertujuan untuk menghilangkan *smear layer* dan mempersiapkan permukaan dentin untuk menerima bahan adhesif. Prosedur etsa menyebabkan demineralisasi komponen anorganik gigi sehingga terbentuk retensi berupa mikroporositas yang akan terisi oleh bahan adhesif.³

Bahan etsa asam fosfat konsentrasi 32-37% paling banyak digunakan pada sistem restorasi adhesif. Bahan ini merupakan asam kuat yang aktif pada pH rendah. Asam fosfat tidak hanya mampu menghilangkan *smear layer*, tetapi juga dapat menyebabkan demineralisasi dan membuka tubulus dentin.⁴ Penelitian terdahulu menunjukkan larutnya sebagian besar hidroksi apatit dan terbukanya kolagen setelah aplikasi asam fosfat pada dentin.³

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) merupakan agen khelasi yang bekerja pada pH netral dan efektif menghilangkan *smear layer* sebanding dengan bahan etsa lain yang mempunyai pH rendah.⁴ Penggunaan EDTA untuk menghilangkan *smear layer* tidak mempengaruhi kekerasan dentin sehingga tidak menyebabkan dentin menjadi rapuh.⁵ Aplikasi 0,5 M EDTA (setara dengan EDTA konsentrasi 19%) selama 30 detik terbukti meningkatkan kekuatan pelekatan bahan adhesif dengan dentin dibandingkan asam fosfat 37%⁶ dan dapat meminimalkan kebocoran mikro pada tepi pelekatan antara komposit dan dentin.⁷

Kompleks dentin-pulpa bereaksi terhadap semua rangsangan yang mengenai gigi. Rangsangan dapat berupa karies, trauma, maupun semua tindakan dalam prosedur penumpatan, mulai dari preparasi, pembersihan dan pengeringan kavitas, serta penumpatan dan pemolesannya.⁸ Berbagai zat yang digunakan untuk sterilisasi seperti fenol dan eugenol, pembersih dentin seperti larutan asam, pelapis kavitas serta zat yang terdapat pada bahan tambal, merupakan rangsangan kimiawi yang dapat menyebabkan inflamasi pada pulpa.⁹

Inflamasi merupakan respon perlindungan *host* yang bertujuan untuk menghilangkan penyebab jejas serta sel-sel dan jaringan nekrotik. Inflamasi bekerja dengan menghancurkan atau menetralkan agen berbahaya (misalnya mikroba dan iritan), sehingga akhirnya terjadi proses penyembuhan dan perbaikan jaringan. Pada inflamasi awal, netrofil dan makrofag merupakan sel pertahanan

tubuh pertama terhadap jejas atau infeksi. Selanjutnya sel limfosit berperan pada respon inflamasi kronis.¹⁰

Matriks metalloproteinase (MMP) merupakan enzim golongan endopeptidase yang mampu mendegradasi hampir semua komponen matriks ekstraseluler.¹¹ Hasil penelitian Sulkala dkk., diketahui bahwa MMP-8 merupakan enzim kolagenolitik utama dalam dentin manusia.¹² Matriks metalloproteinase-8 menggunakan kolagen tipe I (tipe kolagen interstisial terbanyak dalam matriks organik dentin) sebagai substrat.¹³ Pada kondisi normal, terdapat ekspresi MMP-8 dalam jumlah rendah dan akan meningkat pada kondisi inflamasi.¹⁴

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek EDTA 19% dan asam fosfat 37% sebagai bahan etsa terhadap jumlah infiltrasi sel inflamasi dan ekspresi MMP-8 pada pulpa gigi.

Bahan dan Metode Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Seluruh prosedur penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Ethylene diamine tetraacetic acid 19% dibuat dengan melarutkan 19 gram serbuk EDTA (berat molekul 372,24 gram/mol) dalam akuades sampai volume 100 cc, aduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut, saring dengan kertas saring, pH disesuaikan hingga 7,4.

Jumlah subjek yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 48 ekor tikus *Sprague Dawley*, tiap kelompok sebanyak 15 ekor dengan pembagian 3 subjek untuk masing-masing kelompok hari pengamatan (1, 3, 5, 7, dan 14 hari setelah perlakuan) dan 3 ekor untuk kelompok tanpa perlakuan. Sebelum dilakukan preparasi kavitas, hewan coba dianestesi secara intramuskular dengan ketamine HCl 0,2 ml/200 gram berat badan. Gigi molar satu rahang atas dipreparasi pada permukaan oklusal menggunakan *diamond round bur* 0,9 (Edenta, Switzerland) dengan kedalaman 0,5 mm. Pada kelompok perlakuan I, diaplikasikan EDTA 19% pada kavitas selama 30 detik menggunakan *microbrush*, selanjutnya bilas dengan akuades selama 30 detik.¹⁵ Kelompok perlakuan II, diaplikasikan gel asam fosfat

37% (Dentamerica, USA) pada kavitas selama 20 detik, selanjutnya bilas dengan akuades selama 30 detik. Kelompok perlakuan III, kavitas hanya dibilas akuades selama 30 detik. Kavitas dikeringkan dengan *cotton pellet* kemudian ditumpat dengan semen ionomer kaca fuji IX.

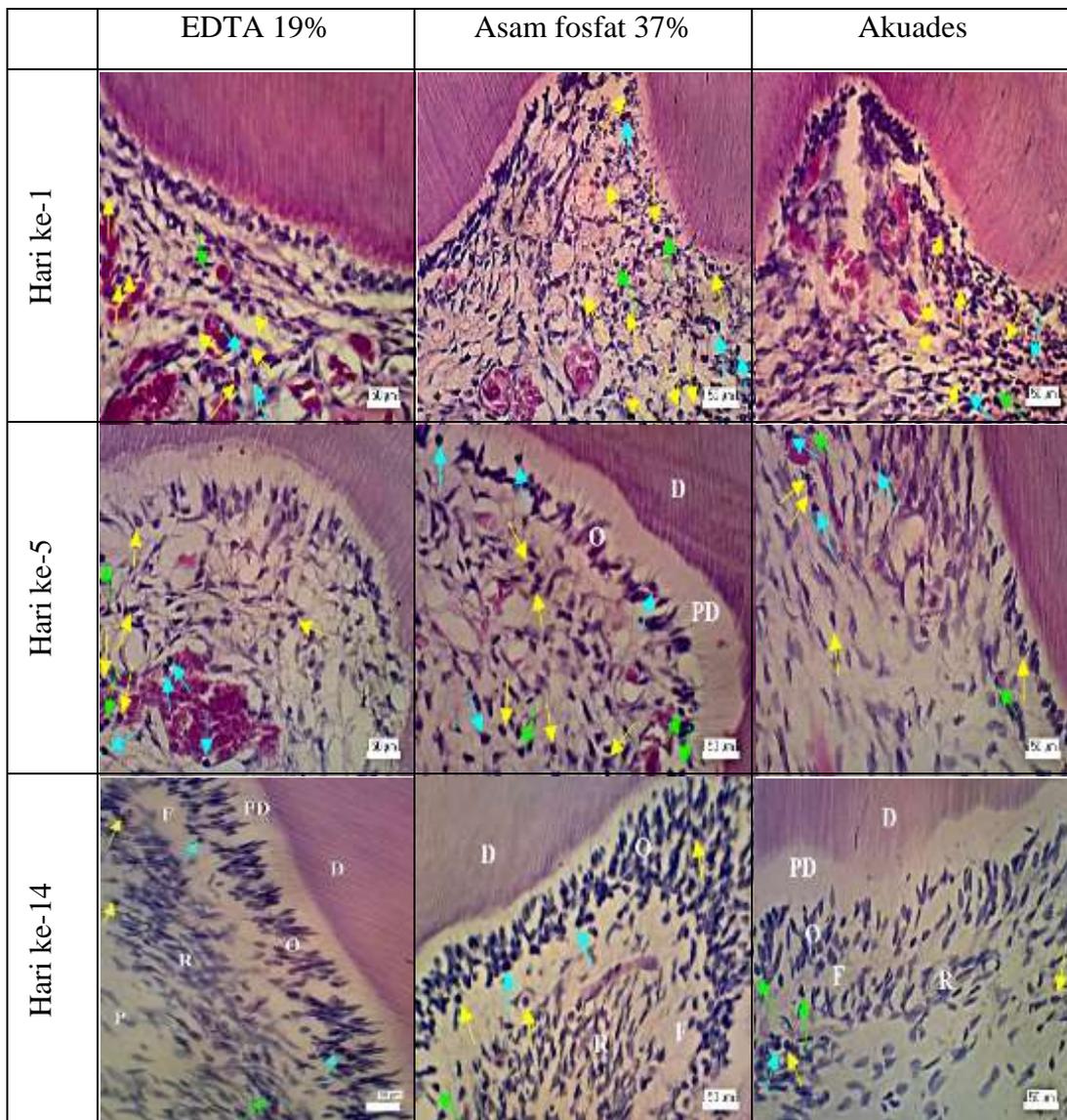
Pada hari ke-1, 3, 5, 7 dan 14 setelah perlakuan, dilakukan dekapitasi hewan coba. Rahang pada bagian gigi molar yang telah diberi perlakuan diambil dan difiksasi dengan *buffered* formalin 10% selama 24 jam. Spesimen kemudian didekalsifikasi menggunakan EDTA 10% pH 7,4 selama 4 minggu pada suhu 4°C. Setelah lunak, spesimen ditanam dalam parafin, dan dipotong dengan ketebalan 5 µm untuk dilakukan pengecatan hematoksilin eosin (HE) dan ketebalan 3 µm untuk pengecatan imunohistokimia (IHC) dengan *rabbit anti rat MMP-8 polyclonal antibody*.

Penghitungan jumlah sel inflamasi (sel netrofil, makrofag dan limfosit) diamati menggunakan mikroskop pada pembesaran 400x. Data yang diperoleh merupakan rerata jumlah infiltrasi sel inflamasi dari 3 lapang pandang yang berbeda area di bawah jejas (preparasi kavitas). Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Anava dua jalur dan *Tuckey HSD*. Pengamatan intensitas warna coklat yang menandakan adanya ekspresi MMP-8 dilakukan dengan skoring.

Hasil

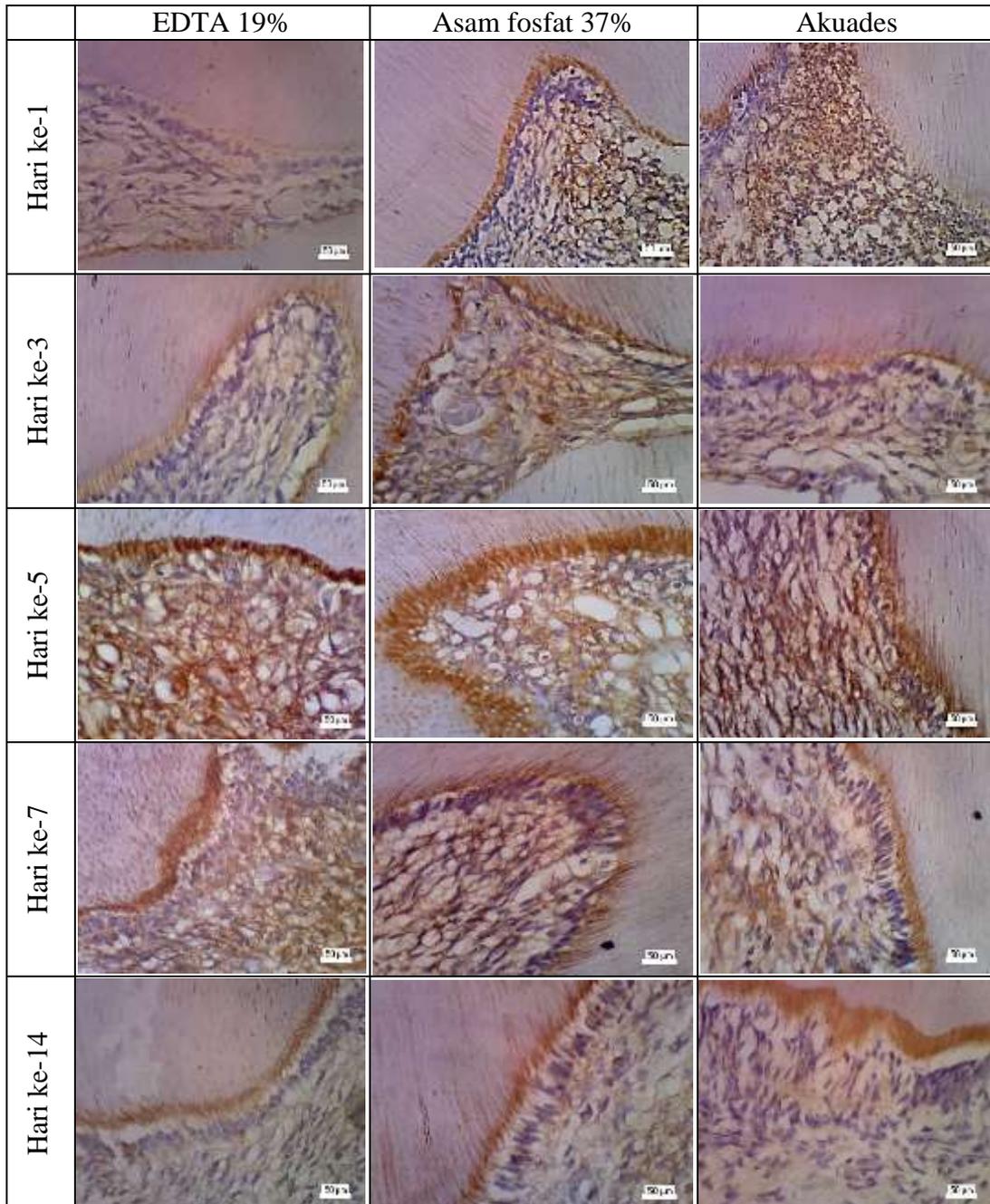
Hasil Anava dua jalur menunjukkan bahwa jumlah netrofil, makrofag dan limfosit berbeda bermakna terhadap waktu pengamatan dan perlakuan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh bermakna terhadap infiltrasi sel inflamasi. Hasil uji *Tuckey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna jumlah infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit antara kelompok dengan aplikasi EDTA 19% bila dibandingkan dengan asam fosfat 37% dan kelompok dengan aplikasi asam fosfat 37% dibandingkan dengan akuades ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dengan aplikasi EDTA 19% dibandingkan akuades ($p > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel netrofil, makrofag dan limfosit yang lebih banyak secara signifikan dibandingkan EDTA 19% maupun akuades.

Hasil pengamatan histologis pulpa gigi setelah aplikasi EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pada hari ke-1 setelah perlakuan, tampak infiltrasi sel inflamasi terutama netrofil. Infiltrasi sel inflamasi pada kelompok dengan aplikasi EDTA 19% tampak lebih sedikit dibandingkan dengan asam fosfat 37%. Jumlah makrofag paling banyak ditemukan pada hari ke-5 setelah perlakuan. Pada semua kelompok hari ke-14 tampak memberikan gambaran pulpa normal. Sel netrofil (↑), makrofag (↑), limfosit (↑). D=dentin, PD=pre dentin, O=odontoblas, F=zona bebas sel, R=zona kaya sel.

Hasil pengamatan ekspresi MMP-8 setelah aplikasi EDTA 19%, asam fosfat 37% dan akuades ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis pulpa dengan pengecatan imunohistokimia anti MMP-8. Pada hari ke-1 tampak MMP-8 terekspresi lemah setelah aplikasi EDTA 19% dibandingkan asam fosfat 37% dan akuades. Pada hari ke-1 ekspresi MMP-8 terutama tampak pada prosesus odontoblas dan sebagian matriks ekstraseluler. Ekspresi MMP-8 paling kuat pada hari ke-5 pada semua kelompok, pada seluruh matriks ekstraseluler.

Ekspresi MMP-8 menurun hingga hari ke-14 dan terutama tampak pada area predentin.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi infiltrasi sel inflamasi setelah dilakukan preparasi kavitas dan aplikasi EDTA 19% serta asam fosfat 37%. Aplikasi asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi lebih banyak dibandingkan EDTA 19%. Hal ini kemungkinan karena pH asam fosfat 37% yang lebih rendah dibandingkan EDTA 19%. Asam fosfat 37% merupakan asam kuat dengan pH yang sangat rendah yaitu 0,26. Bahan etsa asam dengan pH rendah bersifat hipertonik. Apabila lingkungan di luar sel bersifat hipertonik, maka cairan di dalam sitoplasma akan tertarik ke luar dan sel akan mengkerut. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan permanen pada sel odontoblas dan menyebabkan reaksi inflamasi yang akan memicu respon jaringan berupa infiltrasi sel-sel inflamasi ke daerah jejas untuk mengeliminasi iritan dan debris seluler.¹⁶

Pada kondisi normal, terdapat sel makrofag dan sel dendritik sebagai *antigen presenting cell* (APC) pada pulpa yang akan mengenali iritan dan debris seluler.¹⁷ Iritan dan kerusakan sel/jaringan merupakan sinyal bagi makrofag sehingga teraktivasi dan akan mensekresi sitokin antara lain IL-1 dan TNF- α . Interleukin-1 dan TNF- α akan menginduksi sel endotel untuk menghasilkan E-selektin dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Kedua molekul adhesi tersebut akan berikatan dengan ligan pada netrofil sehingga menyebabkan netrofil bergerak, teraktivasi dan akan melekat pada dinding endotelium. Langkah berikutnya dalam proses ini adalah migrasi netrofil melalui endotelium menuju lokasi jejas.¹⁰ *Tumor necrosis factor- α* dapat menginduksi sel endotel dan sel dendritik untuk menghasilkan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) yang akan menyebabkan monosit keluar dari pembuluh darah menuju ke daerah inflamasi. Di jaringan, monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag.¹⁷

Sel dendritik merupakan APC utama yang terlibat pada respon imun pulpa, berfungsi mendeteksi dan menangkap antigen untuk diproses dan dipecah menjadi fragmen peptida. Sel dendritik setelah menangkap dan memproses antigen akan bergerak memasuki jaringan limfoid dan akan dipresentasikan pada limfosit T

melalui molekul *major histocompatibility complex* (MHC) klas II. Hal ini merupakan sinyal bagi aktivasi limfosit untuk membelah dan berdiferensiasi.^{18,19,20} Molekul MHC klas II juga diekspresikan pada permukaan sel makrofag yang akan mempresentasikan antigen pada limfosit T. Setelah makrofag memproses antigen, akan mensekresi IL-1 dan IL-12. Interleukin-1 akan memberi sinyal kepada limfosit T *helper* untuk berikatan dengan molekul MHC klas II pada makrofag dan IL-12 berperan pada aktivasi limfosit.²¹

Hasil penelitian ini juga menunjukkan terjadinya infiltrasi sel inflamasi pada tikus yang diaplikasi akuades. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh preparasi kavitas yang dilakukan. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Feng Mei dkk., bahwa gesekan dan panas yang dihasilkan dari penggunaan *rotary instrument* menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi *nitric oxide* (NO) pada sel odontoblas.²² *Nitric oxide* merupakan radikal bebas yang dihasilkan dari enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Radikal bebas tersebut berperan pada proses inflamasi dan kerusakan jaringan serta dapat menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sehingga sel inflamasi bermigrasi dari pembuluh darah menuju ke jaringan.²³

Pada hari ke-14 setelah perlakuan tampak jumlah infiltrasi sel inflamasi yang semakin sedikit dibandingkan hari-hari sebelumnya. Hal ini mengindikasikan bahwa sel imun berhasil menghilangkan iritan dan debris seluler sehingga inflamasi tidak berlanjut. Selain itu kompleks dentin pulpa memiliki mekanisme perlindungan diri dalam membatasi penetrasi bahan-bahan yang membahayakan pulpa. Ion kalsium, fosfat dan cairan yang terdapat dalam tubulus dentin mempunyai kapasitas buffer untuk menetralkan asam dari bahan etsa.¹⁷

Penggunaan glass ionomer sebagai bahan tumpatan dalam penelitian ini bertujuan untuk meminimalkan iritasi pada pulpa bila dibandingkan dengan resin komposit.²⁴ Pada penelitian ini tidak digunakan bahan tumpatan sementara oleh karena daya tahan yang rendah dalam rongga mulut.²⁵ Apabila tumpatan sementara lepas akan terjadi deposit debris dan sisa makanan yang dapat menyebabkan inflamasi pulpa²⁶ sehingga mempengaruhi hasil penelitian.

Peningkatan ekspresi MMP-8 dibanding gigi normal terlihat pada penelitian ini, baik pada kelompok yang diaplikasikan EDTA 19%, asam fosfat 37% maupun akuades. Hal ini mengindikasikan bahwa inflamasi yang disebabkan oleh preparasi kavitas dan aplikasi bahan etsa mempengaruhi ekspresi MMP-8. Seperti yang dikemukakan oleh Sorsa dkk., pada kondisi normal terdapat ekspresi MMP-8 dalam jumlah rendah dan akan meningkat pada kondisi inflamasi.²⁷ Peningkatan ekspresi MMP-8 oleh sel odontoblas dan fibroblas pulpa dapat diinduksi adanya sitokin pro inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 yang dihasilkan oleh sel odontoblas dan makrofag. Sel odontoblas dan fibroblas akan mensekresikan MMP-8 ke matriks ekstraseluler melalui proses eksositosis sesaat setelah disintesis. Pada kondisi inflamasi, MMP-8 berperan pada kerusakan jaringan dengan mendegradasi matriks ekstraseluler.¹⁷ Matriks metalloproteinase-8 merupakan enzim lisosomal yang disimpan dalam granula interseluler, yang akan disekresikan ke matriks ekstraseluler pada saat netrofil dan makrofag teraktivasi. Apabila terjadi peningkatan jumlah infiltrasi sel netrofil dan makrofag pada kondisi inflamasi, maka akan meningkatkan ekspresi MMP-8.¹⁴

Ekspresi MMP-8 menurun hingga hari ke-14 setelah perlakuan seiring dengan menurunnya jumlah infiltrasi sel inflamasi, hal ini juga tampak gambaran ekspresi MMP-8 hari ke-14 terutama pada area pre dentin. Protein MMP-8 disekresikan oleh sel odontoblas ke area pre dentin kemungkinan berhubungan dengan proses pembentukan dentin tersier. Degradasi matriks ekstraseluler merupakan sinyal bagi odontoblas untuk mensekresi matriks baru yang berperan dalam perbaikan pulpa. Pre dentin merupakan zona untuk organisasi kolagen sebelum terjadi mineralisasi. Keberadaan MMP-8 pada pre dentin dan dentin menunjukkan bahwa MMP diperlukan selama organisasi matriks sebelum terjadi mineralisasi. Matriks metalloproteinase-8 pada pre dentin akan mendegradasi matriks kolagen sehingga memungkinkan deposisi ion mineral untuk selanjutnya terjadi mineralisasi.¹³

Kesimpulan

Dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa asam fosfat 37% menyebabkan infiltrasi sel inflamasi yang lebih banyak dan ekspresi MMP-8 yang lebih kuat dibanding EDTA 19%. Meskipun EDTA 19% dan asam fosfat 37% menyebabkan inflamasi, namun kondisi pulpa tampak normal pada hari ke-14 setelah perlakuan.

Daftar Pustaka

1. Roberson, TM., Harald O.H., dan Edward J.S. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, Fifth Edition. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. h. 68-69, 283-285.
2. Walmsley, A.D., Walsh, T.F., Lumley, P.J., Burke, F.J.T., Shortall, A.C., Hayes-Hall, R., dan Pretty, I.A. Restorative Dentistry, Second edition. Philadelphia: Elsevier; 2007. p. 76-78.
3. Summit, J.B., Robbins, J.W., Hilton, T., dan Schwartz, R. Fundamentals of Operative Dentistry. A contemporary Approach. Third Edition. Illinois: Quintessence Publishing Co., Inc.; 2006. p. 188-192.
4. Cederlund, A., Jonsson, B., dan Blomlof, J. Shear Strength after Ethylenediaminetetraacetic Acid Conditioning of Dentin. Acta Odontol. Scand., 2001; 59: 418-22.
5. Swift, E.J.Jr., Perdigao, J., Wilber, A.D.Jr., Heymann, H.O., Sturdevant, J.R., dan Bayne, S.C. Clinical Evaluation of Two One-Bottle Dentin Adhesives at Three Years. J. Am. Dent. Ass., 2001; 132: 11-7.
6. Jacques, P. dan Hebling, J. Effect of Dentin Conditioners on Microtensile bond Strength of a Conventional and a Self-Etching Primer Adhesive System. Dent. Mater., 2005; 21: 103-9.
7. Shafiei, F. dan Memarpour, M. Effect of EDTA Conditioning on Mikroleakage of Four Adhesive System in Composite Restorations. J. Dent., 2008; 5(3): 150-5.
8. Sundoro, E.H. Serba-Serbi Ilmu Konservasi Gigi. Jakarta: Universitas Indonesia Press; 2005. h. 115-29.
9. Walton, R. dan Torabinejad, M. Principles and Practice of Endodontics.

Terjemahan: Narlan Sumawinata, Prinsip dan Praktek Ilmu Endodonsi Edisi 3, Jakarta: EGC; 2008. h. 10-20, 30-5.

10. Kumar, V., Abbas, A., dan Fausto, N. Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease. 8th edition. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 48-85.
11. Sulkala, M., 2004, Matrix metalloproteinase (MMPs) in dentin-pulp complex of healthy and carious teeth (internet), <<http://hercules oulu.fi/isbn9514274598/isbn9514274598.pdf>> (diakses 14 januari 2012).
12. Sulkala, M., Tervahatala, T., Sorsa, T., Larmas, M., Salo, T., dan Tjaderhane, L., 2007, "Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8) is the Major Collagenase in Human Dentin", Arch. Oral Biol., 52: 121-127.
13. Palosaari, H., Wahlgren, J., Larmas, M., Ronka, H., Sorsa, T., Salo, T., dan Tjaderhane, L., 2000, "The Expression of MMP-8 in Human Odontoblasts and Dental Pulp Cells is Down-Regulated by TGF Beta-1", J. Dent. Res., 79: 77-84.
14. Wahlgren, J., Salo, T., Teronen, O., Luoto, H., Sorsa, T., dan Tjaderhane, L., 2002, "Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8) in Pulpal and Periapical Inflammation and Periapical Root Canal Exudates", Int. Endod. J., 35: 897-904.
15. Stape, T.H.S., Menezes, M.S., Barreto, B.C.F., Aguiar, F.H.B., Martins, L.R., dan Quagliatto, P.S., 2012, "Influence of Matrix Metalloproteinase Synthetic Inhibitors on Dentin Microtensile Bond Strength of Resin Cements", Op. Dent., 37(4): 386-396.
16. Nemeth, L., Erman, A., dan Stiblar-Martincic, D., 2006, "Early Odontoblastic Layer Response to Cavity Preparation and Acid Etching in Rats", Folia Biol. (Krakow), 54: 23-30.
17. Hargreaves, M.K. dan Goodis, H.E., 2002, *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, Carlos Stream: Quintessence Publishing Co.,Inc., hal. 13, 42, 54, 65, 69, 95-96, 137-139.
18. Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., dan Bergenholtz, G., 1998, "Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp", Crit. Rev. Oral Biol. Med., 9: 179.

19. Lo Hahn, C., dan Liewehr, F.R., 2007a, "Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries", *J. Endod.*, 33:643–651.
20. Lo Hahn, C., dan Liewehr, F.R., 2007b, "Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp", *J. Endod.*, 33:773–781.
21. Raven, Johnson, Mason dan Singer, 2007, *Biology, 9th Edition*, New York: Mosby Elsevier, hal. 1156-1158.
22. Feng Mei, Y., Yamaza, T., Atsuta, I., Danjo, A., Yamashita, Y., Kido, M.A., Goto, M., Akamine, A., dan Tanaka, T., 2007, "Sequential Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Nitrotyrosine in Odontoblasts and Pulp Cells During Dentin Repair After Tooth Preparation in Rat Molars", *Cell Tissue Res.*, 328: 117–127.
23. Roitt, I.M., 2002, *Imunologi-Essential Immunology*, Edisi 8, alih bahasa: Alida Harahap dkk., Jakarta: Widya Medika, hal. 233.
24. Rendjova, V., Gjorgoski, I., Ristoski T., dan Apostolska, S., 2012, "In vivo Study of Pulp Reaction to Glass Ionomer Cements and Dentin Adhesives", *Sec. Biol. Med. Sci.*, XXXIII; 1: 265–277.
25. Schmalz, G., dan Arenholt-Bindslev, D., 2009, *Biocompatibility of Dental Materials*, Berlin: Springer, hal. 151.
26. Bocangel, J.S., Demarco, F.F., Palmar, R.G., Turbino, M.L., dan Matson, E., "Influence of temporary filling with eugenol-containing cement on adhesion: bond strength, microleakage and SEM evaluation", *Dent. Mater. J.*, 1999; 9:83-94.
27. Sorsa, T., Tjaderhane, L., dan Salo, T., 2004, "Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Oral Diseases", *Oral Diseases*, 10: 311-318.