

Efek Paparan *Streptococcus Mutans* Terhadap Jumlah Sel PMN, Limfosit dan Makrofag Pada Pulpa Gigi

Junti Rosa Veryani¹, Nadie Fatimatuzzahro², Rendra Chriestedy P²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember¹

²Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember²

Korespondensi: Junti Rossa Veryani. Jalan Kalimantan 37 Kampus Tegalboto Jember, Jawa Timur. Email: juntir@yahoo.com

ABSTRACT

Background. Dental pulp inflammation was progress of the caries process. The most common of pulp inflammation was caused by penetration of *Streptococcus mutans*. *Streptococcus mutans* will colonize and cause injury to the pulp tissue by infiltrating inflammatory cells. Currently, very less experimental studies talked about pulp inflammation. **Objective.** This research aimed to analyze the increase number of inflammatory cells PMN, macrophages and lymphocytes in mice exposed *Streptococcus mutans* in the pulp. **Method.** This study used experimental laboratory, the sample divided into three groups, control group (left molar RB rats were intact without treatment), P1 group (left molar RB rats were prepared to pulp perforation), and P2 group (molar RB rats were prepared to pulp perforation and induced *Streptococcus mutans* in the pulp chamber). **Results.** The highest average number of PMN inflammatory cells, lymphocytes and macrophages was in P2 group. PMN cells and lymphocytes found in both treatment groups (P1 and P2), whereas macrophage cells found only in P2 group. Inflammatory cells were not found in the control group. **Conclusion.** it could be concluded that *Streptococcus mutans* exposure could increase the number of inflammatory cells such as PMN, lymphocytes and macrophages.

Keywords: Lymphocyte, Macrophage, PMN, Pulp inflammation, *Streptococcus mutans*.

Pendahuluan

Angka kejadian masalah kesehatan gigi dan mulut di Indonesia tergolong masih tinggi. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Nasional Tahun 2013, prevalensi masalah gigi dan mulut nasional sebesar 25,9%. Menurut Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2010, penyakit pulpa gigi menduduki urutan ketujuh dari sepuluh penyakit terbanyak pasien rawat jalan di rumah sakit di Indonesia. Dari data tersebut diketahui bahwa penyakit pulpa gigi merupakan penyakit di Indonesia yang sering diderita oleh penduduk Indonesia.¹

Penyakit pulpa gigi yang banyak terjadi yaitu pulpitis. Pulpitis

adalah proses inflamasi pada jaringan pulpa gigi yang umumnya merupakan kelanjutan dari proses karies, dan apabila tidak dirawat dapat menyebabkan kematian pulpa (nekrosis). Penyebab paling umum inflamasi pada pulpa adalah penetrasi bakteri karies, seperti *Streptococcus mutans*, *Actinomyces spp* dan bakteri golongan lainnya.² *Streptococcus mutans* merupakan mikroorganisme utama penyebab terjadinya karies. *Streptococcus mutans* memiliki struktur antigenik pada dinding selnya, antara lain peptidoglikan, polisakarida spesifik, *lipoteichoic acid* (LTA), antigen protein (antigen I, II, I/II, III, antigen A, B, C, D, PI, Spa A) yang dapat

memberikan respons imun terhadap karies gigi. Protein-protein tersebut digunakan sebagai antigen untuk menstimulasi terbentuknya antibodi terhadap *S. mutans*.³

Spesies bakteri *S. mutans* akan berkoloni dan menimbulkan cedera jaringan pulpa yang lebih luas dan dalam, serta mengubah sistem mikrosirkulasi jaringan pulpa. Diawali dengan vasodilatasi sistem mikrovaskularisasi yang menyebabkan sirkulasi darah menjadi statis kemudian terjadi mobilisasi leukosit, sel-sel polimorfonuklear (PMN) mengadakan marginasi yang dilanjutkan dengan emigrasi ke jaringan sekitarnya, disebut keadaan inflamasi akut. Apabila proses berlanjut menjadi kronik, tampak gambaran mikroskopik berupa penyebaran sel-sel radang kronik seperti limfosit, sel plasma, histiosit yang aktif, dan makrofag. Sel-sel tersebut muncul oleh karena proses inflamasi dan berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap jejas yang masuk.^{2,4}

Penelitian eksperimental mengenai inflamasi pulpa saat ini masih sedikit, lebih banyak berasal dari hasil penelitian epidemiologi dan observasional. Penelitian Sakinah (2015) mengidentifikasi lesi aterosklerotik koroner pada pulpa gigi tikus yang dipapar *S. mutans* dengan melihat gambaran klinis dan radiografis, namun pada penelitian tersebut belum dilaporkan bagaimana gambaran sel-sel inflamasi pada pulpa secara histologis.⁵ Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti tertarik untuk mengetahui apakah model pulpitis dengan diinduksi *S. mutans* berpengaruh terhadap peningkatan jumlah sel-sel inflamasi.

Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris

dengan persetujuan layak etik dari Unit Etik dan Advokasi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan 12 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan 200-250 gram dan umur 3-4 bulan yang dibagi ke dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol (gigi molar pertama kiri rahang bawah tikus dibiarkan utuh tanpa perlakuan), kelompok P1 (gigi molar pertama kiri rahang bawah tikus dipreparasi hingga perforasi pulpa) dan kelompok P2 (gigi molar pertama kiri rahang bawah tikus dipreparasi hingga perforasi pulpa dan diinduksi *S. mutans*).

Perlakuan pada tikus terlebih dahulu dilakukan pembiusan secara *intramuscular* menggunakan ketamin (@KTM-100 Tangerang-Indonesia) dengan dosis sebanyak 1 ml/kg BB (0,2 ml/ekor tikus). Tikus difiksasi menggunakan *Rat Dental Chair*⁶ dan dibuat kavitas klas I (Klasifikasi Black) pada permukaan oklusal gigi molar pertama kiri rahang bawah menggunakan *low speed* (@*dentamerika*-USA) dengan bur intan *long-shank round end* (d=0,5 mm) hingga mencapai pulpa. *Streptococcus mutans* disuntikkan perlahan pada pulpa gigi sebanyak 0,05ml dengan konsentrasi 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) menggunakan jarum insulin 26G (@Terumo-Jepang) sebanyak tiga kali seminggu selama empat minggu. Pada minggu ke-5, tikus dikorbankan dan diambil tulang rahang daerah interdental gigi molar pertama kiri mandibula, selanjutnya jaringan difiksasi (formalin 10%) kemudian didekalsifikasi menggunakan asam formiat 10%.

Pemrosesan jaringan diawali dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat, kemudian *clearing* menggunakan xylol, selanjutnya dilakukan penanaman dalam parafin dan pemotongan jaringan gigi menggunakan

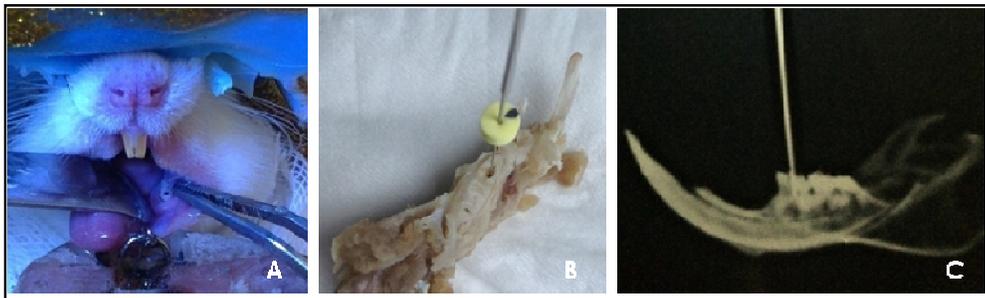
mikrotom dengan ketebalan ± 5 mm.⁷ Pengecatan *Haematoksilin Eosin* (H&E) digunakan untuk melihat jumlah sel inflamasi. Pengamatan dilakukan dari hasil preparat semua kelompok secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Dilakukan penghitungan jumlah sel PMN, makrofag dan limfosit pada ruang pulpa dan saluran akar pada 3 lapang pandang oleh 3 pengamat serta diambil reratanya.

Analisis data menggunakan Uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* dilakukan untuk mengetahui distribusi data, selanjutnya dilakukan *Levene's Test* untuk menguji homogenitas variasi populasi. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji parametrik *One-Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rerata populasi dan

dilanjutkan dengan Uji lanjutan LSD (*Least Significant Difference*) dilakukan untuk mengetahui perbedaan jumlah PMN, makrofag, dan limfosit antar kelompok.

Hasil Penelitian

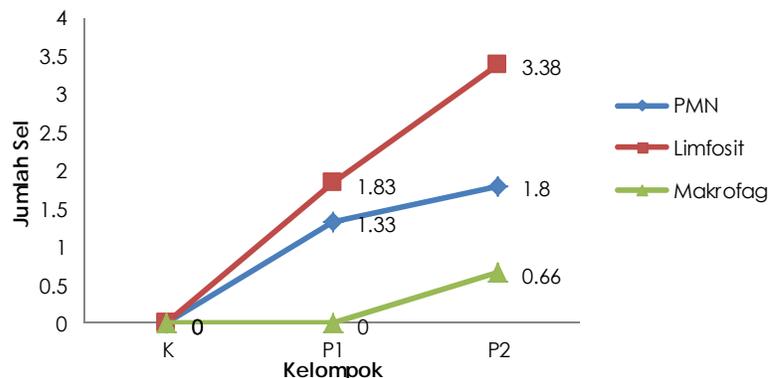
Hasil penelitian eksperimental laboratoris menunjukkan bahwa terjadi pulpitis setelah dilakukan preparasi dan injeksi *S. mutans* pada gigi molar pertama kiri rahang bawah tikus yang diamati secara klinis dan radiografis. Terbukanya kavitas pulpa secara klinis ditandai dengan adanya perdarahan pada oklusal gigi tikus dan jarum *miller* masuk ke dalam kavitas hingga kedalaman ± 2 mm (Gambar 1 A&B). Hasil gambaran radiologis tampak jarum *miller* masuk mencapai ruang pulpa (Gambar 1C).



Gambar 1. Gambaran Klinis dan Radiografis Kavitas Gigi Molar Pertama Kiri Rahang Bawah Tikus Kelompok Perlakuan

A. Adanya perdarahan sesaat setelah dilakukan preparasi pada oklusal gigi. B. Terdapat kavitas yang dalam hingga terjadi perforasi pulpa yang ditunjukkan dengan masuknya jarum *miller*. C. Terlihat jarum *miller* masuk mencapai ruang pulpa yang menunjukkan terjadinya perforasi pulpa.

Peningkatan Rata-rata Jumlah Pmn, Limfosit dan Makrofag



Gambar 2. Diagram Peningkatan Rata-Rata Jumlah PMN, Limfosit dan Makrofag pada Gigi Molar Pertama Rahang Bawah Tikus Wistar Jantan antara Kelompok Kontrol, Kelompok P1 dan Kelompok P2.

Tabel 2. Hasil Uji *One Way ANOVA*

Sel	PMN	Limfosit	Makrofag
Sig.	.001*	.000*	.000*

Keterangan:

* : beda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 3. Hasil Uji LSD

Kelompok	Sig.		
	PMN	Limfosit	Makrofag
K-P1	.010*	.006*	1.000
K-P2	.010*	.000*	.000*
P1-P2	.513	.015*	.000*

Keterangan:

* : beda signifikan ($p < 0,05$)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata jumlah sel inflamasi PMN, limfosit dan makrofag tertinggi pada kelompok P2. Sel PMN dan limfosit dijumpai pada kedua kelompok perlakuan (P1 & P2), sedangkan sel makrofag hanya ditemukan pada kelompok P2. Pada kelompok kontrol sel-sel inflamasi tidak dijumpai. Peningkatan rerata

jumlah sel inflamasi dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 2.

Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* dan homogenitas *Levene's*. Hasil analisis menunjukkan bahwa data jumlah sel PMN, limfosit dan makrofag adalah normal serta homogen ($p > 0,05$). Semua data kemudian dilanjutkan

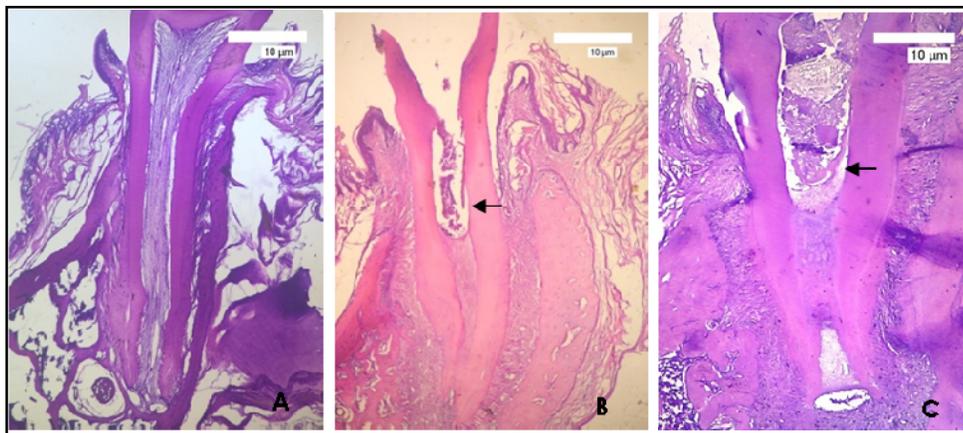
dengan analisis statistik parametrik *One Way ANOVA*.

Hasil uji *One Way ANOVA* (Tabel 2) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) jumlah sel PMN, limfosit dan makrofag antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan maka data diuji lanjutan dengan LSD.

Hasil uji lanjutan LSD (Tabel 3) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) jumlah PMN pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (P1 & P2), tetapi tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) antar kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) jumlah sel limfosit antar semua kelompok. Terdapat perbedaan signifikan

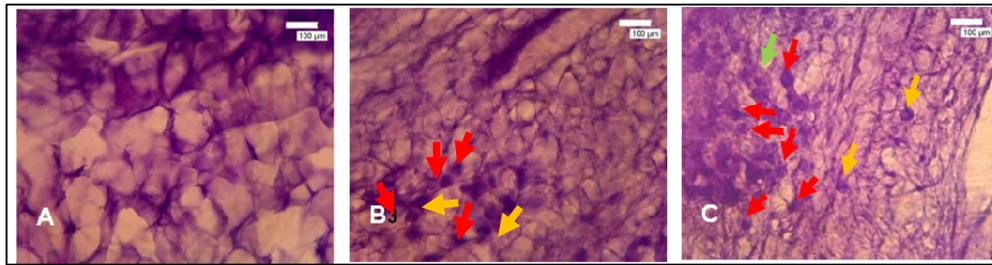
($p < 0,05$) jumlah makrofag antara kelompok kontrol dengan P2 serta kelompok P1 dengan P2, sedangkan kelompok kontrol dengan P1 tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$).

Gambaran histologis pulpa gigi tikus dengan perbesaran 40x menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok. Pada kelompok P2 terdapat gambaran lesi periapikal pada semua sampel (100%). Perbedaan gambaran histologis antar kelompok dapat dilihat jelas pada Gambar 3. Hasil pengamatan dengan perbesaran 1000x, pada kelompok perlakuan (P1 dan P2) menunjukkan pada jaringan yang tersisa didapati sel-sel inflamasi, sedangkan pada kelompok kontrol tidak ditemukan (Gambar 4).



Gambar 3. Gambaran Histologis Pulpa Gigi Tikus dengan Pewarnaan H&E dan Perbesaran 40x.

A. Kelompok kontrol (tanpa perlakuan), terlihat pulpa dan saluran akar gigi normal dan utuh. B. Kelompok P1 (preparasi hingga perforasi), pulpa terbuka dengan jaringan tersisa setengah akar gigi. C. Kelompok P2 (preparasi serta diinduksi *S. mutans*), pulpa terbuka dengan jaringan tersisa kurang dari setengah akar gigi dan terlihat gambaran lesi periapikal (tanda kotak).



Gambar 4. Gambaran Histologis Pulpa Gigi Tikus dengan Pewarnaan H&E dan Perbesaran 1000x.

Kelompok kontrol (A), tidak dijumpai sel inflamasi. Kelompok P1 (B) dan kelompok P2 (C), dijumpai sel PMN (tanda panah kuning), limfosit (tanda panah merah) dan makrofag (tanda panah hijau).

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan gambaran pulpitis dengan induksi *S. mutans* pada pulpa gigi tikus terhadap peningkatan jumlah sel inflamasi PMN, limfosit dan makrofag. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok P2 memiliki jumlah sel inflamasi lebih banyak dibanding kelompok lain. Jumlah sel inflamasi yang tinggi disebabkan oleh tingginya derajat keparahan inflamasi pada kelompok P2, oleh karena penetrasi *S. mutans* menuju saluran akar, sehingga tubuh merespon dengan mensekresikan sel-sel inflamasi untuk memfagosit bakteri dalam melindungi pulpa. Hal ini sesuai dengan penelitian yang melaporkan bahwa terdapat hubungan antara *S. mutans* dengan lesi karies⁸, serta keparahan lesi karies terhadap peningkatan jumlah sel imunokompeten.⁹

Sel PMN paling banyak ditemukan pada kelompok P2. Keadaan ini terjadi karena pada kelompok P2, ruang pulpa terbuka dan dipapar *S. mutans* (3 kali seminggu dalam kurun waktu 4 minggu). Hal tersebut membuat tubuh merespon setiap adanya bakteri dengan menginfiltrasi PMN untuk memfagosit, sehingga secara langsung sel ini akan meningkat jumlahnya pada keadaan

terinfeksi.¹⁰ Respon imun pulpa menggunakan reseptor untuk mendeteksi pola molekul bakteri melalui *Toll-Like Receptors* (TLRs) yang diekspresikan salah satunya oleh odontoblas. TLR berperan untuk mengenali iritan maupun komponen antigen bakteri *S. mutans* seperti *Lipoteichoic acid*, lipopetida, dan peptidoglikan. Odontoblas yang teraktivasi memproduksi sitokin pro-inflamasi untuk mengaktifkan leukosit dalam pembuluh darah. Sitokin seperti Interleukin 8 (IL-8), Interleukin 1 β (IL-1 β) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) berinteraksi dengan sel endotel pembuluh darah untuk menginduksi ekspresi molekul adhesi *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) dan *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) dan kemudian mendorong ekstravasasi PMN ke jaringan.^{11,12}

Hasil penelitian jumlah sel PMN menunjukkan bahwa pada kelompok P2 tidak berbeda signifikan dibanding kelompok P1. Hal tersebut diduga disebabkan oleh karena pada penelitian, kelompok perlakuan diamati pada hari ke-29 sehingga kemungkinan keadaan inflamasi sudah menjadi kronis. Sesuai dengan penelitian Galli *et al.* (2011) yang mengevaluasi secara *in vitro* masa hidup PMN pada mencit dan manusia beredar pada 5-10 jam, sedangkan menurut Phyllay *et*

al. (2010) secara *in vivo* masa hidup PMN dapat bertahan hingga 5,4 hari.^{13,14} Kemungkinan lain dapat disebabkan karena jumlah sampel yang digunakan peneliti minimal, dan sedikitnya jaringan pulpa gigi tikus yang tersisa untuk diamati sehingga kurang mampu menyimpulkan secara umum hasil penelitian.

Pada penelitian ini, limfosit meningkat secara signifikan pada kelompok P2 dibanding kelompok lain. Hal ini diduga oleh karena penelitian dilakukan dalam kurun waktu 4 minggu, sehingga proses inflamasi terjadi berkepanjangan dan berkelanjutan, akibatnya sel limfosit berinfiltrasi ke tempat infeksi. Teraktivasi sel limfosit, terjadi setelah aktivitas PMN menuju jaringan dan memfagositosis bakteri. Limfosit keluar dari jaringan limfoid dan menyebabkan perubahan sirkulasi pembuluh darah, kemudian bermigrasi menuju daerah yang terinfeksi. Limfosit yang teraktivasi memerlukan waktu beberapa hari untuk melakukan ekspansi dalam jumlah besar.¹⁵ Kovacevic *et al.* (2008) melaporkan bahwa pada keadaan kronis dan nekrosis pulpa parsialis terjadi peningkatan jumlah limfosit pada pulpa gigi anjing yang terbuka pada hari ke 20, 35 dan 50.¹⁶

Hasil pengamatan menunjukkan sel makrofag hanya ditemukan pada kelompok P2. Jumlah sel ini meningkat sesuai dengan tingkat keparahan penyakit. Sel makrofag memfagositosis bakteri dan produknya setelah PMN tak mampu lagi mengatasinya.¹⁷ Monosit yang teraktivasi oleh toksin bakteri memproduksi berbagai sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) dan Interleukin 1 (IL-1).¹⁸ Sitokin tersebut memicu monosit dalam pembuluh darah berinfiltrasi menjadi makrofag menuju ke tempat terinfeksi.¹² Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada

kelompok P1 makrofag tidak ditemukan. Hal ini diduga terjadi karena sedikitnya mikroba yang berperan, sehingga masih bisa direspon oleh sel lainnya.¹⁹ Pada kelompok kontrol tidak ditemukan sel inflamasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa pada pulpa normal yang diekstraksi dari gigi yang telah *mature* tidak ditemukan sel lain kecuali fibroblas dan serat kolagen.²⁰

Hasil pengamatan histologis menunjukkan pada kedua kelompok perlakuan (P1 & P2) ditemukan sel PMN dan limfosit, sedangkan makrofag hanya ditemukan pada kelompok P2. Sel tersebut merupakan sel inflamasi yang terdapat pada keadaan akut (PMN) dan kronis (limfosit dan makrofag). Keadaan inflamasi ini dapat terjadi perubahan dari akut menjadi kronis, kronis kembali menjadi akut, bahkan bersamaan, bergantung pada jumlah iritan dan waktu lama terpaparnya iritan.²¹ Polimorfonukleus (PMN) yang tidak mampu menghilangkan patogen, dapat menyebabkan inflamasi persisten yaitu respon akut berlangsung terus menerus kemudian bersamaan menjadi inflamasi kronis.²² Hal ini didukung dengan penelitian Kovacevic *et al.* (2008), transisi dari pulpitis menjadi periapikal periodontitis, pada lesi periapikal gigi anjing secara histologis ditemukan gambaran makrofag, PMN, sel mast, limfosit yang muncul bersamaan.¹⁶ Pergantian sel inflamasi akut dan kronis pada penelitian ini belum diketahui secara pasti waktu terjadinya, hal ini kemungkinan karena tidak adanya variasi waktu dan dosis yang dilakukan peneliti sehingga kurang mampu menyimpulkan hasil penelitian.

Hasil penelitian pada kelompok P2 menunjukkan adanya

gambaran nekrosis pulpa dan lesi periapikal. Keberadaan sel-sel inflamasi oleh invasi bakteri menyebabkan perubahan histologis pulpa. Invasi bakteri mengakibatkan kerusakan bahkan kematian (nekrosis) pulpa, terutama oleh karena sitokin berupa IL-1 dan TNF- α yang diekspresikan makrofag.^{23,24} Interleukin-1 dan TNF- α pada odontoblas meregulasi ekspresi *Matrix Metalloproteases-8* (MMP-8) yang menyebabkan kerusakan jaringan konektif pulpa bahkan dapat terjadi nekrosis pulpa.^{24,25} Penyebaran IL-1 dan mediator pro-inflamasi lain menstimulasi fibroblas untuk menghasilkan kolagenase serta merangsang terjadinya destruksi jaringan hingga terbentuk suatu lesi periapikal.^{17,26} Tagger dan Massler (1975) dan Yamasaki *et. al* (1994) menyatakan bahwa inflamasi pada pulpa gigi tikus berkembang secara cepat menjadi ulseratif pulpitis setelah 2-3 hari dan nekrosis pulpa setelah hari ke-7. Pada penelitian tersebut juga mengkonfirmasi adanya apikal periodontitis berkembang sebelum terjadi nekrosis pulpa totalis.^{27,28}

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa induksi *Streptococcus mutans* dapat meningkatkan jumlah sel inflamasi berupa PMN, limfosit dan makrofag. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi hari dan variasi dosis *Streptococcus mutans*, sehingga dapat diketahui sel-sel yang muncul paling dominan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek BOPTN Kemenristek dan Dikti tahun 2013 yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf> 2013, diakses pada 14 Februari 2016.
2. Soerono Akbar SM. *Penyakit Endodontik dalam Endodontologi*, Kumpulan Naskah 1991-2003, Edisi 1. 2003.
3. Taubman AM dan David AN. The Molecular Pathogenesis of Dental Caries Associated with Mutans Streptococci. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 555-563.
4. Fouad AF dan Huang TJG. *Inflammation and Immunological Responses*. 6th ed. 2008.
5. Sakinah NN. *Identifikasi Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Pulpitis*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember: Skripsi. 2015.
6. Putradjaka Agus Murdojohadi. *Rat Dental Chair*. Bagian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2014.
7. Sabir A. Respons Inflamasi pada Pulpa Gigi Tikus Setelah Aplikasi Ekstrak Etanol Propolis. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*. 2005.
8. Thibodeau EA dan O'Sullivan DM. Salivary mutans streptococci and Caries Development in the Primary and Mixed Dentitions of Children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999; 27(6): 406-12.
9. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K dan Sakai H. Immunohistochemical Study on the Immunocompetent Cells of the Pulp in Human Non-Carious

- and Carious Teeth. *Arch Biol.* 1995; 40: 609.
10. Morison MJ. *Manajemen Luka.* Jakarta: EGC. 2003.
 11. Haniastuti T. Potential Role of Odontoblasts in the Innate Immune Response of the Dental Pulp. *Dental Journal* 2008; 41(3): 2-4.
 12. Kumar Vinay, Cotran RS, dan Robbins SL. *Buku Ajar Patologi.* Edisi 7. Jakarta: EGC, 2007.
 13. Galli SJ, Borregaard N, dan Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol.* 2011; 12: 1035–1044.
 14. Pillay J. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; 116: 625–627.
 15. Rifai M. *Imunitas Innate dan Adaptif.* <http://muhammadrifai.lecture.ub.ac.id/files/2011/01/BAB-V.-PRINSIP-UMUM-IMUNITAS-INNATE-DAN-ADAPTIF.pdf> 2011. Diakses pada 22 Februari 2016.
 16. Kovacevic M, Tamarut T, Jonjic N, Braut A, dan Kovacevic M. The Transition from Pulpitis to Periapical Periodontitis in Dog's Teeth. *Australian Endod Journal.* 2008; 34: 12-18.
 17. Hargreaves KM dan Berman LH. *Cohen's Pathways of the Pulp.* Eleventh Edition. Philadelphia, USA: Elsevier Inc. 2016.
 18. Bratawidjaja, Karen G, dan Rengganis I. *Imunologi Dasar.* Edisi ke 8. Jakarta : FKUI, 2009.
 19. Hargreaves KM dan Goodis HE. *Seltzer and Bender's Dental Pulp.* Quintessence Publishing Co, Inc. China, 2002.
 20. Nica LMD dan Raica M. Normal and Inflammatory Human Dental Pulp: a Morphohistochemical Approach. *Timisoara Medical Journal* 2004; 54: 70-73.
 21. Rubin E dan Reisner HM. *Essentials of Rubin's Pathology Fifth Edition.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009.
 22. Graves DT, Chen C, Douville C, dan Jiang Y. Interleukin-1 Receptor Signaling rather than that of the Tumor Necrosis Factor is Critical in Protecting the Host from the Severe Consequences of a Polymicrobial Anaerobic Infection. *Infection and Immunity* 2000; 68(8); 4746-4751.
 23. Sasaki H, Okamoto Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, dan Stashenko P. The interleukin-10 Knockout Mouse is Highly Susceptible to Porphyromonas gingivalis Induced Alveolar Bone Loss. *Journal of Periodontal Research* 2004; 39(6); 432-441.
 24. Tani-ishi N, Wang CY, dan Stashenko P. Immunolocalization of Bone Resorptive Cytokines in Rat Pulp and Periodontal Lesions Following Surgical Pulp Exposure. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 213-9.
 25. Bergenholtz G. Evidence for Bacterial Causation of Adverse Pulpal Responses in Resin-Based Dental Restorations. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 467–480.
 26. Torabinejad MWR dan Walton RE. *Endodontics Principles and Practice.* ed t, editor: St.Louis Missouri: Saunders Elsevier, 2009.
 27. Tagger M dan Massler M. Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg.* 1975; 39: 304–17.
 28. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka Nakamura H, dan KameYama Y. Pulpal and Periapical Tissue Reactions After Experimental Pulpal Exposure in Rats. *J Endod.* 1994; 20: 13–17.