

EKSPRESI MATRIKS METALLOPROTEINASE-8 DAN INTERLEUKIN-8 PADA KERUSAKAN JARINGAN PERIAPIKAL AKIBAT INDUKSI BAKTERI *ENTEROCOCCUS FAECALIS* (Studi Eksperimental Laboratoris Pada Tikus Wistar)

MATRIKS METALLOPROTEINASE-8 and INTERLEUKIN-8 EXPRESSION IN PERIAPICAL TISSUE DAMAGE DUE TO ENTEROCOCCUS FAECALIS INDUCTION

Tamara Yuanita¹, Tantri Wismaning Radito², Dian Agustin W¹, Roelianto¹

¹Departemen Konservasi Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Mahasiswa Spesialis Departemen Konservasi Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. *The main etiology of endodontic treatment failure is caused by bacteria that stay in the root canal. E.faecalis is a bacteria that is found as an etiology of endodontic treatment failure. Cell wall of this bacteria is containing Lipoteichoic acid (LTA). LTA can penetrate into the periradicular tissue, act as endotoxin in host and cause periradicular inflammation and destruction. It occurs due to the capability of IL-8 to enhance the inflammation reaction and MMP-8 to stop the collagen formation. The ability of enterococcus faecalis in enhancing inflammation process cause host can not reach the homeostasis phase and performing an even bigger tissue damage.* **Purpose.** *The aim of this study is to know about the expression of MMP-8 and IL-8 during the periapical tissue damage due to induction of E.faecalis.* **Method.** *This study used laboratory experimental with the post test only control group design. A total of 54 male rats were randomly divided into 2 main groups, which each main group had 3 subgroups. Group A (control) : every tooth was induced only by sterile BHIb. Group A had 3 subgroups (A Control day 3, 10, and 21), group B : every tooth was induced by 10 µl BHI-b E.faecalis ATCC212(10⁶ CFU), it was contained 3 subgroups (B day 3,10, and 21). The animals were sacrificed based on their days scheduled group and prepared for histological examination of tissue damage, then we did the immunohistochemistry followed by calculation on the light microscope.* **Result.** *The analysis revealed that the expression of MMP-8 and IL-8 increased significantly in group B when E.faecalis was induced.* **Conclusion.** *From this study we know that the expression of MMP-8 and IL-8 are increasing during the periapical tissue damage that induced by E.faecalis.*

Keywords : MMP-8, IL-8, E.faecalis, tissue damage

PENDAHULUAN

Kegagalan perawatan saluran akar gigi dapat disebabkan karena : 1) terbanyak disebabkan oleh bakteri karena kompleksitas anatomi saluran akar gigi mengakibatkan eliminasi bakteri dan produknya tidak dapat dilakukan dengan baik, 2) benda asing misalnya bahan pengisian, 3) jejas trauma.¹

Bakteri yang paling sering didapatkan pada kegagalan perawatan saluran akar adalah *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gram positif.² LTA merupakan komponen virulensi utama dari *Enterococcus faecalis* yang dapat menyebabkan inflamasi dan menimbulkan respon imun oleh host.

LTA dilaporkan menstimulasi leukosit untuk melepas mediator-mediator inflamasi, termasuk TNF- α , IL-1 β , IL-6,

IL-8 dan MMP8.³ Mediator radang yang berperan pada kerusakan jaringan periapikal adalah IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α . IL-1 yang akan menstimulasi aktivitas osteoklas sehingga menyebabkan resorpsi tulang. IL-6 berfungsi menstimulasi resorpsi tulang dan menghambat pembentukan tulang. IL-8 berfungsi menstimulasi kerusakan jaringan ikat dan resorpsi tulang. Hal ini menyebabkan apoptosis pada sel-sel (osteoblas, osteoklas, jaringan ikat ligamen periodontal, makrofag dan neutrofil) sehingga terjadi kerusakan periradikuler.⁴

MMP8 adalah keluarga dari MMPs yang mampu mendegradasi seluruh komponen matriks ekstraseluler termasuk kolagen dan proteoglikan. MMPs memegang peranan penting dalam remodelling jaringan normal dan pertumbuhan. Begitu juga dalam kondisi inflamasi jaringan periodontal, pulpa dan periapikal, ekspresi MMP diregulasi melalui sitokin pro-inflamasi. MMP merupakan endopeptidase yang merupakan mediator penting terhadap kerusakan jaringan pada inflamasi yang memecah sebagian besar matriks ekstraseluler dan membran basalis.⁵ Diantara MMP, kolagenasi (MMP-1,-8,-13) merupakan matriks metaloproteinase yang terbanyak dan mempunyai kapasitas merusak kolagen interstitial. MMP-8 (kolagenase-2) pada kondisi patologis mampu memecah kolagen dan laminin.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris. Sampel penelitian menggunakan tikus jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dewasa, jantan, umur 8 - 12 minggu, berat badan antara 120 - 150 gram, dengan alasan perubahan berat badan selama penelitian relatif kecil, gigi molar sudah tumbuh sempurna, kondisi fisik sehat. Besar sampel yang digunakan tiap-tiap kelompok adalah sebanyak 9 ekor tikus Wistar sehingga

total sampel yang digunakan sebesar 54 ekor tikus Wistar. Tindakan awal yaitu tikus difixir pada papan retraksi rahang kemudian dilakukan tindakan perforasi atap pulpa molar atas dengan menggunakan mata bur no ¼. Tikus yang telah memenuhi persyaratan dilakukan anestesi via intra peritoneal dengan injeksi ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg berat badan.⁶ Setelah itu penutupan kavitas menggunakan resin GIC pasca penetrasi *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10⁶ CFU.

Ada dua kelompok penelitian: Kelompok Perlakuan A. Sebagai kelompok kontrol, dilakukan preparasi gigi hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi BHIb steril. Kelompok Perlakuan B dilakukan preparasi gigi hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi 10 μ l BHI-b berisi bakteri *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10⁶ CFU dengan mikropipet. Tiap – tiap kelompok, baik kelompok A maupun B memiliki 3 sub kelompok, yaitu A hari ke 3, 10, dan 21, serta B hari ke 3, 10, dan 21. Lalu hewan coba dikorbankan sesuai dengan kelompok masing-masing harinya, yaitu hari ke 3, 10, dan 21. Tahap selanjutnya yaitu pemotongan jaringan dengan langkah-langkah sebagai berikut, euthanasia pada tikus dilakukan dengan dislokasi servikal, lalu tikus difiksasi pada meja kerja lalu dilakukan dekapitasi serta pemisahan cranium dengan mandibula. Masing-masing potongan rahang difiksasi pada 10% buffer formalin netral selama 24 jam dan didekalsifikasikan pada EDTA 4% selama 30 hari kemudian dilakukan pembuatan sediaan blok parafin. Kemudian dilakukan pembuatan sediaan HPA (preparat) sehingga dapat dilihat adanya kerusakan tulang periapikal. Setelah dipastikan telah terjadi kerusakan maka selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti MMP-8 dan IL-8 agar dapat dilihat dengan perbesaran 1000x pada 20 lapang pandang dalam mikroskop cahaya untuk

selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah sel limfosit yang mengekspresikan MMP-8 dan IL-8 di jaringan periapikal. Untuk kebutuhan inferensial, maka data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisa dengan uji statistik, yaitu: Uji normalitas untuk melihat apakah mempunyai distribusi yang normal dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov Test, Uji homogenitas untuk melihat homogenitas variant berdasarkan populasi berat badan umurnya dengan uji Levene Test, dan Uji t-test satu arah untuk melihat adanya pengaruh induksi *E.faecalis* terhadap perbedaan jumlah sel MMP-8 dan IL-8 pada setiap kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B). Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$.

HASIL DAN DISKUSI

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris. Sampel penelitian menggunakan tikus jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dewasa, jantan, umur 8 - 12 minggu, berat badan antara 120 - 150 gram, dengan alasan perubahan berat badan selama penelitian relatif kecil, gigi molar sudah tumbuh sempurna, kondisi fisik sehat. Besar sampel yang digunakan tiap-tiap kelompok adalah sebanyak 9 ekor tikus Wistar sehingga total sampel yang digunakan sebesar 54 ekor tikus Wistar. Tindakan awal yaitu tikus difixir pada papan retraksi rahang kemudian dilakukan tindakan perforasi atap pulpa molar atas dengan menggunakan mata bur no ¼. Tikus yang telah memenuhi persyaratan dilakukan anastesi via intra peritoneal dengan injeksi ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg berat badan.⁶ Setelah itu penutupan kavitas menggunakan resin GIC pasca penetrasi *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10^6 CFU.

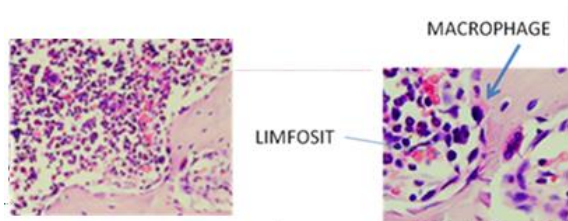
Ada dua kelompok penelitian: Kelompok Perlakuan A. Sebagai kelompok kontrol, dilakukan preparasi gigi

hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi BHIb steril. Kelompok Perlakuan B dilakukan preparasi gigi hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi 10 µl BHI-b berisi bakteri *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10^6 CFU dengan mikropipet. Tiap – tiap kelompok, baik kelompok A maupun B memiliki 3 sub kelompok, yaitu A hari ke 3, 10, dan 21, serta B hari ke 3, 10, dan 21. Lalu hewan coba dikorbankan sesuai dengan kelompok masing-masing harinya, yaitu hari ke 3, 10, dan 21. Tahap selanjutnya yaitu pemotongan jaringan dengan langkah-langkah sebagai berikut, euthanasia pada tikus dilakukan dengan dislokasi servikal, lalu tikus difiksasi pada meja kerja lalu dilakukan dekaputasi serta pemisahan cranium dengan mandibula. Masing-masing potongan rahang difiksasi pada 10% buffer formalin netral selama 24 jam dan didekalsifikasikan pada EDTA 4% selama 30 hari kemudian dilakukan pembuatan sediaan blok parafin. Kemudian dilakukan pembuatan sediaan HPA (preparat) sehingga dapat dilihat adanya kerusakan tulang periapikal. Setelah dipastikan telah terjadi kerusakan maka selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti MMP-8 dan IL-8 agar dapat dilihat dengan perbesaran 1000x pada 20 lapang pandang dalam mikroskop cahaya untuk selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah sel limfosit yang mengekspresikan MMP-8 dan IL-8 di periapikal. Untuk kebutuhan inferensial, maka data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisa dengan uji statistik, yaitu: Uji normalitas untuk melihat apakah mempunyai distribusi yang normal dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov Test, Uji homogenitas untuk melihat homogenitas variant berdasarkan populasi berat badan umurnya dengan uji Levene Test, dan Uji t-test satu arah untuk melihat adanya pengaruh induksi *E.faecalis* terhadap perbedaan jumlah sel MMP-8 dan IL-8 pada setiap kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B).

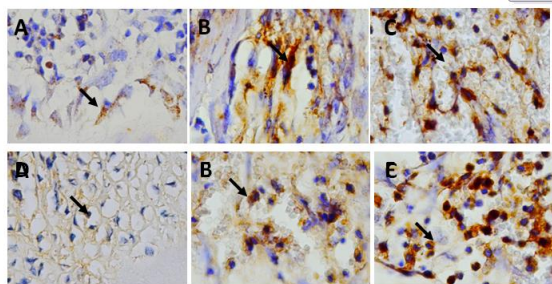
Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$.

HASIL DAN DISKUSI

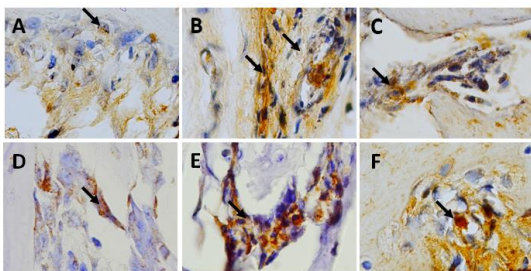
Hasil gambaran secara histopatologis pada kelompok penelitian dengan induksi *E.faecalis* tampak sel-sel limfosit pada daerah jaringan periapikal.



Hasil gambaran imunohistokimia pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tampak ekspresi MMP-8 dan IL-8 pada daerah jaringan periapikal.



Gb. 5.1.1.c Gambaran ekspresi MMP-8 (warna coklat) pada preparat imunohistokimia gigi molar RA tikus wistar A) Kontrol hari ke3, B) Kontrol hari ke 10, C) kontrol hari ke 21, D) Perlakuan hari 3, E) Perlakuan hari ke 10, F) Perlakuan hari ke 21. (Pembesaran 1000x pada 20 lapang pandang). Tampak ekspresi MMP-8 semakin meningkat dari hari 3 hingga ke 21 pada kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 5.1.2.c Gambaran ekspresi IL-8 (warna coklat) pada preparat imunohistokimia gigi molar RA tikus wistar A) Kontrol hari ke3, B) Kontrol hari ke 10, C) kontrol hari ke 21, D) Perlakuan hari 3, E) Perlakuan hari ke 10, F) Perlakuan hari ke 21. (Pembesaran 1000x pada 20 lapang pandang). Tampak ekspresi IL-8 semakin meningkat dari hari 3 hingga ke 21 pada kelompok kontrol dan perlakuan..

Dari hasil penelitian dan analisis penelitian peningkatan jumlah ekspresi MMP-8 dan IL-8 akibat induksi bakteri *E.faecalis* pada kerusakan jaringan periapikal yang dibagi dalam dua kelompok, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan induksi didapatkan hasil seperti pada tabel di bawah ini :

Tabel 6. Uji Independent T-test Ekspresi MMP-8 dan IL-8

	Nilai P		
	Kontrol 3 & perlakuan 3	Kontrol 10 & perlakuan 10	Kontrol 21 & perlakuan 21
MMP-8	0,001	0,000	0,000
IL-8	0,004	0,000	0,000

Dari tabel di atas semua nilai $p < 0,05$ sehingga terdapat beda yang signifikan jumlah ekspresi MMP-8 dan IL-8 antara kelompok kontrol dengan perlakuan sesuai dengan harinya pada kerusakan jaringan periapikal akibat induksi *E.faecalis*.

DISKUSI

Kegagalan perawatan saluran akar dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan periapikal. Invasi bakteri dan kerusakan jaringan periapikal akan diikuti oleh respon imun tubuh. Bakteri dan komponen dinding selnya akan bereaksi dengan monosit (makrofag) dengan sistem sel imun serta fibroblas yang menyebabkan pelepasan sitokin

proinflamatori diantaranya IL-1 β and TNF- α . Pelepasan sitokin IL-1 dan TNF- α akan mengakibatkan kerusakan pada jaringan periapikal. Makrofag yang teraktivasi menghasilkan berbagai macam sitokin yang sebagian besar merupakan sitokin proinflamatori (TNF- α dan IL-1) dan kemotaktik (IL-8). TNF- α secara intensif akan mempengaruhi respon lokal vaskular, resorpsi tulang oleh osteoklas dan sebagai mediator yang mendeградasi matriks ekstraselular.⁷

Bakteri yang paling resisten adalah *enterococcus faecalis*. *E.faecalis* dapat bertahan selama perawatan saluran akar karena bakteri ini mempunyai karakteristik *Innate alkalo-tolerant* yang dapat memompa proton sehingga terjadi transportasi kation dan proton ke dalam sel untuk memelihara sitoplasma pada keadaan pH netral.⁸ *E.faecalis* masih tetap dapat bertahan hidup meskipun diberikan medikamen kalsium hidroksida. Bakteri *E. faecalis* mempunyai kemampuan menembus 400 μm dalam waktu 2 minggu sedangkan kemampuan penetrasi larutan irigasi maksimal hanya sekitar 10 μm .⁹

Faktor virulen *E.faecalis* adalah *Lipoteichoic acid* (LTA). LTA merupakan unsur utama dari *outer envelope* bakteri gram positif. LTA dapat dikenali oleh molekul *signaling* spesifik pada permukaan sel *host* yang disebut *Toll-like receptors-2* (TLR-2) yang akan mengaktifkan respon imun.¹⁰ Respon imun terhadap benda asing/antigen terdiri dari beberapa tahapan yang akan terjadi pada periode hari ke 0-7 dimana terjadi *recognition phase* dan *activation phase*. Tahapan akan berlanjut pada hari 7-14 dimana terjadi *activation phase* dan *efector phase*. Tahapan selanjutnya akan terjadi pada hari 14-30 yaitu fase homeostasis yang merupakan fase perbaikan.¹¹

Respon imun yang terjadi akibat adanya bakteri *E.faecalis* melalui pengenalan LTA oleh TLR-2 akan menghasilkan proses peradangan jaringan periapikal, di mana karena virulensi dari

E.faecalis yang tinggi maka proses itu berlanjut menjadi suatu kerusakan jaringan periapikal.

Hasil penelitian pada kelompok kontrol hari ketiga menunjukkan mulai adanya ekspresi MMP-8 dan IL-8. Hal ini sesuai dengan pola umum peradangan akibat antigen secara umum yaitu pada hari ke 0-3 terjadi *recognition and activation phase*. Sel yang berperan pada fase ini adalah *Naive B lymphosit*, *Naive T lymphosi*, *Antigen Presenting Cell* yang berfungsi untuk mengenali dan merespon antigen yang masuk lalu menyeleksi dan mengaktifkan sel-sel respon imun agar nantinya dapat bekerja mengeliminasi antigen. Fase ini adalah *innate immunity* yang merupakan baris terdepan perlindungan tubuh.¹¹

Penelitian hari ke 10 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol terdapat ekspresi MMP-8 dan IL-8 yang lebih tinggi dibandingkan dengan hari ke 3. Sesuai dengan pola peradangan akibat antigen bahwa pada hari ke 7-14 terjadi *activation and effector phase*. Sel yang berperan adalah *Effector T Lymphosit* dan sel-sel pada *adaptive immunity*. Antibodi dan limfosit T mengeliminasi ekstraseluler dan intraseluler. Fungsi dari *innate immunity* sama dengan *adaptive immunity*, tetapi *adaptive immunity* dapat membantu meningkatkan fungsi dari *innate immunity*. Peningkatan fungsi ini dibuktikan dengan meningkatnya ekspresi MMP-8 dan IL-8).¹¹

Begitu juga dengan hasil penelitian pada hari ke 21 pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa sudah terjadi penurunan ekspresi MMP-8 dan IL-8. Hal ini sesuai dengan pola peradangan yang menunjukkan bahwa di hari 14-30 adalah *effector phase and homeostasis*, sel-sel yang berperan pada fase efektor mulai menurun diikuti oleh kenaikan fase homeostasis. Pada proses ini terjadi suatu apoptosis dimana banyak sel limfosit yang mati.¹¹ Dibuktikan dengan hasil penelitian

bahwa ekspresi MMP-8 dan IL-8 sudah mengalami penurunan sebagai proses homeostasis.

IL-8 merupakan sitokin yang diidentifikasi mempunyai aktivitas *chemotactic (chemokines)* yang merupakan neutrofil *chemoattractant* selektif. IL-8 merupakan *chemoattractant* PMN yang didapatkan di jaringan gingiva sehat. IL-8 adalah pertahanan tubuh pertama dengan cara meningkatkan fagositosis, membunuh bakteri, mengeluarkan enzim lisosomal, dan amin superoksida. Hal ini mengindikasikan mekanisme yang penting pada imunitas innate.¹²

Interleukin 8 akan menyebabkan degranulasi neutrofil, sehingga mengakibatkan pengeluaran elastase dan laktoferin. Elastase yang dilepaskan akan mengakibatkan kebocoran plasma dan kerusakan jaringan sehingga terjadi kerusakan akumulatif di endotel.¹³ Hal ini kemungkinan disebabkan tingginya jumlah IL-8 secara terus menerus sehingga jumlah neutrofil yang berfungsi dalam proses peradangan akan terus tinggi. Pada saat peradangan terus terjadi maka NF κ B secara terus menerus menghasilkan sitokin proinflamasi berupa IL-1 β dan TNF- α , kedua sitokin tersebut berperan menstimulasi keluarnya MMP-8 dalam jaringan yang akan menyebabkan kerusakan jaringan.

MMP-8 adalah Matriks metalloproteinase (MMPs) merupakan enzim proteinase yang utama yang terlibat dalam destruksi jaringan periodontal dengan adanya degradasi molekul matriks ekstraseluler. MMP-8 dalam bentuk aktif akan laten dideteksi dengan teknik imunoblotting menggunakan antibodi spesifik, aktivitas MMP-8 diukur dengan adanya degradasi kolagen.

Keberadaan bakteri patogen pada jaringan periodontal akan merangsang sitokin proinflamasi seperti TNF α , IL-1 β , yang akan merangsang ekspresi dan

aktivasi MMPs sehingga merusak matriks jaringan ikat.

KESIMPULAN

Dengan demikian, dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa jumlah sel pengeksresi MMP-8 dan IL-8 pada kerusakan tulang periapikal gigi tikus Wistar yang diinduksi bakteri *E.faecalis* lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siquera JF Jr and Rocas IN. 2004. Polymerase Chain Reaction Based Analysis of Microorganisms Associated with Failed Endodontic Treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97 : 85-90.
2. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M dan Moiseiwitsch J. 2001. Bacteria Isolated After Unsuccessful Endodontic Treatment in A North American Population. Journal Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology Endodontics, 91:579-86.
3. Baik JE, Han JY and Kum KY. 2008. Lipoteichoic Acid Partially Contributes to The Inflammatory Responses to *Enterococcus faecalis*. J.Endod. 34(8) : 975-982
4. S. Liapatas, M. Nakou, and D. Rontogianni, "Inflammatory

- infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study,” *International Endodontic Journal*, vol. 36, no. 7, pp. 464–471, 2003.
5. Wahjuningrum, Dian Agustin. 2011. Patogenesis Molekuler Resorpsi Tulang Alveolaris pada Periodontitis Apikalis akibat induksi LPS di dalam Saluran Akar Gigi. Disertasi Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor. Universitas Airlangga
 6. Stashenko et al., 2007. Th1 Immune Response Promotes Severe Bone Resorption Caused by *Porphyromonas gingivalis*. *American Journal of Pathology*.170: Pp.203-13
 7. Stuart CH, Schawrtz SA, Beeson TJ and Owatz CB. 2006. *Enterococcus faecalis* :Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Re-Treatment. *JOE*. 32 (2) : 93-98.
 8. Chaves DPL. 2004. Gram-Positive Organisms in Endodontic Infections. *Endodontic Topics*. 9 : 79-96.
 9. Yuanita T. 2012. Mekanisme Imunopatobiologi Resorpsi Tulang Periapikal Gigi Pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga
 10. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., dan Pober, J.S.(2010). *Cellular and Molecular Immunology*. Edisi ke-6. Philadelphia: WB Saunders Company. Hal 12-16
 11. Rechenberg, Dan-K. Bostanci , Nagihan. Zehnder, Matthias. Belibasakis, Georgios N. Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis.
 12. Cecilia Oliveira SILVA, Alesandra. Rubio, FARLA Miriam. FONTES, Alexandra. Sampaio, CAMPOS Marcia. Neves, CAVALCANTI Bruno. 2009. Interleukin -1 Beta and Interlukin in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci* 17 (5) : 527-32.