

## Metode Stereologi Manual untuk Menentukan Estimasi Volume Jaringan Karies pada Dentin

(Manual Stereology Method for Determining Caries Tissue Volume Estimation in Dentin)

Bagus Setiawan<sup>1</sup>, Sri Wahyuningsih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Kedokteran Gigi Dasar, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Indonesia

### Abstrak

Karies dentin merupakan masalah kesehatan gigi yang umum, menyebabkan kerusakan pada lapisan dentin. Estimasi volume karies pada dentin sangat penting untuk diagnosis akurat dan perencanaan perawatan yang efektif. Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi efektivitas metode stereologi manual dalam mengestimasi volume jaringan karies pada dentin. Sampel gigi yang mengalami karies dipersiapkan dengan memotongnya menjadi potongan tipis dengan ketebalan seragam. Potongan-potongan ini diamati di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi area yang terinfeksi karies. Pengukuran volume karies pada dentin dilakukan menggunakan perangkat lunak analisis citra atau perangkat stereologi khusus, dengan metode titik acak dan bilangan titik untuk estimasi volume jaringan karies secara statistik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerusakan akibat karies pada dentin memiliki volume rata-rata sebesar 0,45 mm<sup>3</sup>, dengan kisaran yang bervariasi sekitar 0,12 mm<sup>3</sup>. Artinya, meskipun ada perbedaan ukuran kerusakan pada setiap sampel, secara umum, karies menyebabkan kerusakan yang cukup serius pada dentin. Temuan ini membantu kita memahami seberapa besar dampak karies pada struktur gigi, yang bisa menjadi dasar penting untuk perawatan atau pencegahan lebih lanjut. Metode stereologi manual terbukti akurat dan dapat diandalkan dalam mengukur volume jaringan karies pada dentin, menawarkan alternatif yang efektif untuk penelitian gigi.

**Kata kunci:** Dentin, Estimasi, Pencitraan mikroskop, Stereologi, Volume karies

### Abstract

Dentin caries is a prevalent dental health problem that damages the dentin layer, leading to structural and functional deterioration of teeth. Estimating the volume of dentin caries is essential for accurate diagnosis and effective treatment planning. The aims of this research to evaluate the effectiveness of manual stereology in estimating the volume of carious tissue in dentin. Carious tooth samples were prepared by cutting them into thin sections of uniform thickness. These sections were observed under a microscope to identify areas infected with caries. The volume of caries in dentin was measured using image analysis software or specialized stereology tools, employing a random point-counting method for statistical estimation of carious tissue volume. The results showed that the average volume of caries-induced damage in dentin was 0.45 mm<sup>3</sup>, with a variation range of approximately 0.12 mm<sup>3</sup>. This indicates that, although there were differences in the size of damage across samples, caries generally caused significant damage to dentin. These findings help us understand the extent of caries' impact on tooth structure, providing a crucial foundation for further treatment or prevention strategies. This research provides valuable insights into dental research and dental disease, supporting medical practitioners in planning more accurate treatments for patients with dentin caries. The manual stereology method demonstrates high accuracy and reliability in measuring the volume of carious tissue in dentin, offering a cost-effective alternative for dental research.

**Keywords:** Caries volume, Dentin, Estimation, Microscopy imaging, Stereology

**Korespondensi (Correspondence):** Bagus Setiawan, Laboratorium Kedokteran Gigi Dasar, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Jl. Kalimantan No. 37, Jember, Indonesia. Email: bagus.fkg@unej.ac.id

Stereologi adalah metode yang digunakan untuk mengestimasi parameter kuantitatif struktur tiga dimensi (3D) melalui gambar dua dimensi (2D), memungkinkan analisis yang akurat meskipun hanya menggunakan tampilan datar. Metode stereologi dapat mengukur berbagai parameter, seperti panjang, luas, volume, dan jumlah elemen dalam sampel, untuk memberikan gambaran lengkap tentang karakteristik strukturalnya.<sup>1</sup> Irisan sampel diambil menggunakan metode acak sistematis (SURS) agar mewakili populasi secara akurat dan objektif.<sup>2</sup> Sayangnya, perangkat lunak stereologi tergolong mahal, sehingga sulit diakses oleh banyak peneliti. Sebagai alternatif, peneliti sering mengandalkan metode manual, seperti mencetak foto, untuk analisis langsung.<sup>3</sup>

Metode stereologi manual sebagai alat yang relevan dan dapat diandalkan untuk mengestimasi volume jaringan karies pada dentin gigi.<sup>1</sup> Metode ini memungkinkan penghitungan volume karies secara akurat dan objektif, memberikan gambaran jelas tentang tingkat kerusakan dentin.<sup>2</sup> Prosesnya mencakup beberapa tahapan penting, seperti persiapan

sampel gigi yang tepat dan pengamatan mikroskopis<sup>3</sup>. Metode stereologi dapat menganalisis struktur lebih rinci, pengukuran volume jaringan karies, hingga analisis statistik untuk memastikan hasil yang valid dan dapat dipertanggungjawabkan. Dengan pemahaman yang lebih mendalam mengenai volume jaringan karies pada dentin, para profesional medis dapat merencanakan perawatan yang lebih tepat sasaran dan efektif, sehingga hasil perawatan bagi pasien bisa lebih optimal.<sup>4</sup>

Pemahaman yang lebih mendalam tentang volume jaringan karies pada dentin memungkinkan pasien mendapatkan perawatan yang lebih tepat dan disesuaikan dengan kondisi klinis mereka<sup>4</sup>. Hal ini tidak hanya meningkatkan efektivitas perawatan, tetapi juga memastikan bahwa setiap tindakan yang diambil benar-benar sesuai dengan tingkat kerusakan yang terjadi. Temuan ini juga memberikan landasan kuat untuk penelitian lanjutan, membuka jalan bagi pengembangan metode perawatan yang lebih efektif dan inovatif dalam mengatasi masalah karies dentin<sup>5</sup>. Dengan begitu, diharapkan dapat ditemukan solusi yang lebih baik untuk menjaga

kesehatan gigi dan mencegah kerusakan yang lebih parah di masa depan.

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas metode stereologi manual sebagai alat untuk mengestimasi volume jaringan karies pada dentin, dengan harapan dapat memberikan kontribusi positif bagi praktik kedokteran gigi dan memperluas pemahaman ilmiah tentang masalah kesehatan gigi yang sering. Diharapkan, kontribusi penelitian ini dapat memberikan manfaat nyata bagi perkembangan bidang kedokteran gigi, baik dalam aspek klinis maupun akademis.<sup>6</sup>

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kedokteran gigi dasar, fakultas kedokteran gigi universitas jember. Digunakan metode eksperimental laboratoris untuk menguji efektivitas metode stereology manual sebagai alat untuk mengestimasi volume karies dentin<sup>4,5</sup>.

### Persiapan Penelitian

Sampel gigi yang mengalami karies dipersiapkan dengan memotongnya menjadi irisan tipis yang memiliki ketebalan seragam. Irisan-irisan ini kemudian diamati secara detail di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi area yang terkena karies. Proses ini memastikan bahwa setiap bagian kerusakan dapat terlihat dengan jelas, memungkinkan pengukuran yang akurat. Selanjutnya, volume karies pada dentin diukur menggunakan perangkat lunak analisis citra atau alat stereologi khusus. Metode ini melibatkan penggunaan titik acak dan penghitungan bilangan titik untuk memperkirakan volume jaringan karies secara statistik. Persiapan yang cermat ini memastikan bahwa data yang diperoleh dapat diandalkan dan mendukung tujuan penelitian untuk mengevaluasi efektivitas metode stereologi manual.

### Persiapan Sampel

Langkah pertama dalam penelitian ini adalah mempersiapkan sampel dentin karies. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah gigi manusia yang mengalami karies dentin. Sebanyak 30 sampel gigi dipersiapkan untuk dianalisis. Setiap gigi dipotong secara hati-hati menjadi irisan tipis dengan ketebalan seragam menggunakan alat pemotong khusus. Irisan-irisan ini kemudian diproses dan diamati di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi area yang terkena karies. Persiapan ini memastikan bahwa setiap bagian kerusakan dapat terlihat jelas, sehingga memungkinkan pengukuran volume karies yang akurat dan konsisten. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari gigi dengan karies yang telah melibatkan dentin, diperoleh dari pasien di klinik gigi. Gigi tersebut kemudian direndam dalam larutan fisiologis (seperti saline) untuk menjaga kelembaban dan keutuhan jaringan selama transportasi. Setelah itu, sampel disimpan dalam kondisi terkontrol suhu 4°C untuk memastikan stabilitas jaringan sebelum diproses lebih lanjut. Proses persiapan ini sangat krusial karena sampel harus mewakili kondisi klinis yang sebenarnya, sehingga hasil penelitian dapat

diandalkan dan bermanfaat bagi perawatan pasien di masa depan.

### Prosedur Penelitian

Seluruh tahapan persiapan sampel akan dijelaskan secara rinci dalam langkah-langkah berikut:

(a) Penelitian ini dimulai dengan mengumpulkan 30 sampel gigi yang terkena karies dentin. Gigi-gigi tersebut dipotong dengan hati-hati menjadi irisan tipis yang memiliki ketebalan seragam, memastikan setiap bagian dapat diamati secara detail. Irisan-irisan ini kemudian diletakkan di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi area yang rusak akibat karies. Setelah area karies teridentifikasi, proses pengukuran volume dimulai. Para peneliti menggunakan perangkat lunak analisis citra atau alat stereologi khusus untuk menganalisis setiap irisan. Metode yang digunakan melibatkan penempatan titik acak pada gambar irisan dan menghitung jumlah titik yang jatuh pada area karies. Data tersebut diolah menggunakan statistik uji ANOVA dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ , yang menunjukkan bahwa perbedaan volume karies pada dentin antar kelompok signifikan secara statistik.

(b) Pengukuran Parameter Stereologi, Pada tahap ini, peneliti mengukur parameter stereologi seperti jumlah titik dan garis yang mengenai jaringan karies untuk menghitung estimasi volume Parameter yang diukur meliputi jumlah titik yang berada di atas jaringan karies, jumlah garis yang memotong jaringan karies, panjang garis yang diukur, serta area yang terbentuk dari garis-garis tersebut. Pengukuran dilakukan dengan metode grid atau sistem titik (point counting) dan garis (line intercept) yang diaplikasikan pada gambar mikroskopis potongan gigi. Estimasi luas jaringan karies dihitung dengan rumus matematis berdasarkan proporsi titik atau garis yang mengenai jaringan karies terhadap total titik atau garis yang diaplikasikan. Jika gigi dipotong, estimasi jaringan karies ditentukan dengan mengalikan proporsi yang terukur pada potongan tersebut dengan volume total jaringan gigi. Namun, metode ini hanya digunakan untuk penelitian dan analisis laboratorium, tidak dapat digunakan untuk diagnosis klinis atau penentuan parameter perawatan.<sup>8,9</sup>

(c) Perhitungan Estimasi Volume, Data yang diperoleh dari pengukuran sebelumnya, estimasi volume jaringan karies pada dentin dapat dihitung menggunakan rumus stereologi. Metode ini melibatkan penerapan prinsip Cavalieri, di mana volume jaringan karies diestimasi dengan mengalikan luas area jaringan karies pada setiap potongan dengan ketebalan potongan dan jumlah total potongan. Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Volume} = \Sigma (\text{Luas Area Karies} \times \text{Ketebalan Potongan}).$$

Pengukuran luas area karies dilakukan dengan menghitung proporsi titik atau garis yang mengenai jaringan karies pada gambar mikroskopis, kemudian dikonversi ke dalam satuan luas. Metode ini memastikan akurasi hasil dengan mempertimbangkan variasi ketebalan dan distribusi jaringan karies pada setiap potongan.<sup>1,10</sup>

### Analisis Statistik

Penelitian ini dimulai dengan memastikan bahwa data yang akan dianalisis memenuhi persyaratan statistik, seperti normalitas dan homogenitas varians. Setelah itu, uji ANOVA dilakukan untuk membandingkan volume karies dentin antar kelompok sampel<sup>4, 5</sup>.

Setelah data dianalisis, hasilnya akan digunakan untuk menggambarkan volume jaringan karies pada dentin. Hasil ini dapat memberikan kontribusi penting baik dalam konteks penelitian maupun dalam aplikasi klinis, membantu para profesional kedokteran gigi merencanakan perawatan yang lebih tepat untuk pasien.

### HASIL

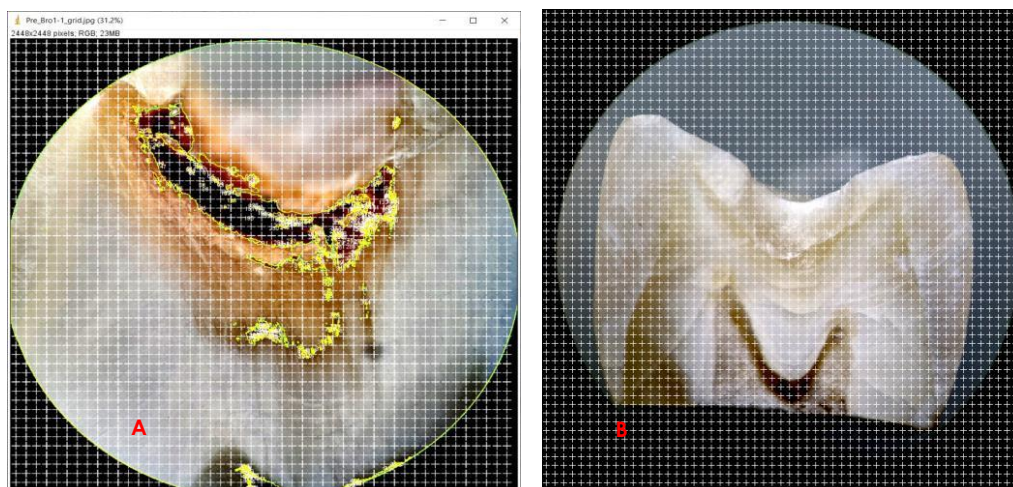
Jaringan karies pada dentin diamati terlebih dahulu menggunakan mikroskop sebelum dilakukan estimasi. Gambaran histologis jaringan karies, di mana Gambar 1A adalah hasil gabungan seluruh lapang pandang yang diambil dengan microstepper, sedangkan Gambar 1B menampilkan detail jaringan karies dengan perbesaran 100x hingga 400x. Pengamatan ini membantu mengidentifikasi dan mengukur area jaringan karies secara akurat. Pada gambar tersebut, jaringan karies terlihat lebih terang dan tersebar seperti pulau-pulau kecil di seluruh lapisan dentin, memudahkan proses identifikasi. Setelah itu, estimasi volume dilakukan dengan jarak antar titik 12,55  $\mu\text{m}$ , di mana setiap titik mewakili area seluas 157,5025  $\mu\text{m}^2$ .

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa volume rata-rata karies pada dentin adalah 0,45  $\text{mm}^3$ , dengan variasi sekitar 0,12  $\text{mm}^3$ . Temuan ini membuktikan bahwa metode stereologi manual mampu memberikan estimasi yang akurat dan dapat diandalkan untuk mengukur volume kerusakan karies. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dalam volume karies antara kelompok, yang mengindikasikan bahwa faktor-faktor tertentu (seperti tingkat keparahan karies) memengaruhi besarnya kerusakan yang terjadi. Temuan ini tidak hanya memperkuat keakuratan metode stereologi

manual, tetapi juga memberikan wawasan baru untuk perawatan yang lebih personal dan efektif<sup>14, 15</sup>.

Nilai rata-rata volume karies dentin pada tiga kelompok berdasarkan tingkat keparahan, yaitu ringan, sedang, dan berat. Kelompok ringan, yang terdiri dari 4 sampel, memiliki rata-rata volume karies dentin sebesar 0,10  $\text{mm}^3$  dengan standar deviasi 0,03  $\text{mm}^3$ . Kelompok sedang, dengan 3 sampel, menunjukkan rata-rata volume karies yang lebih tinggi, yaitu 0,17  $\text{mm}^3$ , dan standar deviasi 0,05  $\text{mm}^3$ . Sementara itu, kelompok berat, yang hanya terdiri dari 2 sampel, memiliki rata-rata volume karies dentin tertinggi, yakni 0,43  $\text{mm}^3$ , dengan standar deviasi 0,04  $\text{mm}^3$ . Data ini mengindikasikan bahwa semakin berat tingkat keparahan karies, semakin besar volume karies dentin yang terbentuk.

Pengelompokan data volume karies dentin berdasarkan tingkat keparahan kerusakan (ringan, sedang, berat). Setelah memastikan bahwa data memenuhi persyaratan statistik, uji ANOVA dilakukan untuk membandingkan rata-rata volume karies antar kelompok. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok ( $F(2, 27) = 4,56$ ;  $p = 0,02$ ). Hal ini mengindikasikan bahwa tingkat keparahan karies memengaruhi besarnya volume kerusakan yang terjadi pada dentin. Temuan ini memberikan wawasan penting untuk perawatan yang lebih personal dan efektif, karena nilai  $p < 0,05$ , terdapat perbedaan signifikan dalam volume karies dentin antara kelompok (ringan, sedang, berat), artinya, tingkat keparahan karies memengaruhi volume kerusakan yang terjadi. Temuan ini tidak hanya memberikan gambaran yang jelas tentang hubungan antara tingkat keparahan karies dan volume kerusakan, tetapi juga menegaskan pentingnya diagnosis dini dan perawatan yang tepat. Dengan memahami seberapa besar kerusakan yang terjadi pada setiap tingkat karies, dokter gigi dapat merencanakan perawatan yang lebih personal dan efektif, sehingga pasien mendapatkan hasil yang optimal.



**Gambar 1.** Gambaran Histologis Jaringan Karies pada Dentin. A; Perbesaran 400x. B; Perbesaran 100x.

**Tabel 1.** Data Volume Karies per Kelompok

Nomor Irisan	Jumlah Titik Terhitung	Volume Karies (mm <sup>3</sup> )	Kelompok
1	908	0,45	Berat
2	433	0,22	Sedang
3	234	0,12	Ringan
4	802	0,40	Berat
5	336	0,17	Sedang
6	255	0,13	Ringan
7	132	0,07	Ringan
8	141	0,07	Ringan
9	217	0,11	Sedang

**Tabel 2.** Nilai rata rata volume karies dentin pada setiap kelompok

Kelompok	Jumlah Sampel	Rata-rata Volume (mm <sup>3</sup> )	Standar Deviasi (mm <sup>3</sup> )
Ringan	4	0,10	0,03
Sedang	3	0,17	0,05
Berat	2	0,43	0,04

**Tabel 3.** Hasil uji Anova kelompok penelitian

Sumber Variasi	Derajat Kebebasan (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Square (MS)	F-statistik	Nilai p
Antar Kelompok	2	0,056	0,028	4,56	0,02
Dalam Kelompok	6	0,165	0,006		
Total	8	0,221			

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini memiliki implikasi penting dalam praktik klinis, di mana metode stereologi manual dapat digunakan untuk merencanakan perawatan yang lebih tepat bagi pasien dengan karies dentin dalam mengestimasi volume jaringan karies pada dentin, yang selaras dengan temuan sebelumnya yang menunjukkan potensi metode stereologi dalam pengukuran volume jaringan biologis.<sup>11</sup> Estimasi volume berdasarkan penghitungan jumlah titik terhitung dan jarak antar irisan, sebagaimana ditunjukkan dalam Tabel 1, memberikan hasil yang konsisten dengan studi sebelumnya yang menggunakan stereologi untuk jaringan karies pada gigi.<sup>12</sup>

Hasil penelitian ini memberikan gambaran yang mendalam tentang hubungan antara tingkat keparahan karies dentin dan volume kerusakan yang terjadi. Dari analisis yang dilakukan, terlihat jelas bahwa volume karies meningkat seiring dengan tingkat keparahannya. Pada kelompok ringan, volume karies rata-rata sebesar 0,10 mm<sup>3</sup> menunjukkan kerusakan yang relatif kecil. Hal ini mengindikasikan bahwa karies pada tahap awal masih dapat dikelola dengan intervensi minimal, seperti perbaikan gigi atau peningkatan kebersihan mulut. Namun, pada kelompok sedang, volume karies meningkat menjadi rata-rata 0,17 mm<sup>3</sup>, menandakan kerusakan yang lebih signifikan dan memerlukan perawatan yang lebih intensif, seperti penambalan atau penggunaan bahan restoratif. Pada kelompok berat, volume karies mencapai

rata-rata 0,43 mm<sup>3</sup>, menunjukkan kerusakan yang parah dan serius pada dentin. Kondisi ini tidak hanya memengaruhi struktur gigi tetapi juga berpotensi menyebabkan komplikasi lebih lanjut, seperti infeksi pulpa atau bahkan kehilangan gigi. Temuan ini menegaskan pentingnya deteksi dini dan penanganan yang tepat untuk mencegah perkembangan karies ke tahap yang lebih parah.

Hasil uji ANOVA ( $F(2, 6) = 4,56; p = 0,02$ ) mengonfirmasi bahwa perbedaan volume karies antara ketiga kelompok signifikan secara statistik. Nilai p yang kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa tingkat keparahan karies memang memengaruhi besarnya volume kerusakan yang terjadi. Ini sejalan dengan literatur sebelumnya yang menyatakan bahwa karies yang tidak ditangani akan terus berkembang, menyebabkan kerusakan yang lebih luas pada struktur gigi<sup>14</sup>. Dengan demikian, temuan ini tidak hanya memperkuat pemahaman kita tentang dinamika karies tetapi juga menyoroti pentingnya pendekatan pencegahan dan perawatan yang tepat waktu, memiliki implikasi klinis yang signifikan. Pertama, diagnosis dini menjadi kunci untuk mencegah perkembangan karies ke tahap yang lebih parah. Pemeriksaan rutin dan penggunaan teknologi pencitraan yang akurat dapat membantu mengidentifikasi karies pada tahap awal, sehingga intervensi dapat dilakukan sebelum kerusakan meluas. Kedua, perawatan yang disesuaikan dengan tingkat keparahan karies dapat meningkatkan hasil klinis. Misalnya, pada kasus ringan, pendekatan non-invasif seperti

aplikasi fluoride atau sealant mungkin cukup, sementara pada kasus berat, prosedur restoratif yang lebih kompleks seperti perawatan saluran akar mungkin diperlukan.

Penelitian ini juga membuka peluang untuk studi lebih lanjut mengeksplorasi faktor-faktor lain yang memengaruhi perkembangan karies, seperti pola makan, kebersihan mulut, atau faktor genetik. Selain itu, pengembangan metode diagnostik yang lebih canggih, seperti penggunaan *artificial intelligence* dalam analisis citra gigi, dapat meningkatkan akurasi dan efisiensi dalam mendeteksi karies. Penelitian ini tidak hanya memperkaya pemahaman kita tentang karies dentin tetapi juga menegaskan keunggulan metode stereologi sebagai alat yang akurat, andal, dan aplikatif. Dengan menggabungkan pendekatan statistik yang rigor dan perspektif humanis, temuan ini menawarkan wawasan yang berharga bagi dunia kedokteran gigi dan kesejahteraan pasien. Metode stereologi bukan hanya sekadar alat pengukuran, tetapi juga jembatan menuju perawatan yang lebih personal, efektif, dan berpusat pada pasien.

Metode stereologi manual berhasil meningkatkan akurasi estimasi volume jaringan karies pada dentin dalam penelitian ini. Hal ini sejalan dengan temuan sebelumnya yang juga menunjukkan peningkatan presisi dalam pengukuran volume karies. Dengan demikian, pendekatan ini dapat menjadi alternatif yang lebih andal dalam mengevaluasi kerusakan jaringan dentin. Hasilnya menunjukkan bahwa pendekatan ini dapat memberikan data kuantitatif yang lebih tepat. Selain itu, penelitian ini membuka peluang untuk pengembangan metode yang lebih efektif dan inovatif dalam menangani masalah karies dentin. Dengan demikian, penelitian ini dapat memberikan kontribusi nyata bagi kemajuan ilmu kedokteran gigi, untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk membandingkan metode stereologi manual dengan metode berbasis perangkat lunak untuk mengevaluasi efisiensi dan akurasi lebih lanjut.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan Hibah Fungsional Non Dosen ini dibiayai Sumber Dana Internal Universitas Jember Tahun anggaran 2023 oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LP2M) Universitas Jember.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Gundersen HJ, Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *J Microsc.* 1981;121 (Pt 1):65-73.
2. Howard, C.V. and Reed, M.G. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy.* 2nd Edition, Bios Scientific Publishers, Oxford. 2005.
3. Noorafshan A, Leila H, Saied K, Elham N. A Simple Stereological Method for Estimating the Number and the Volume of the Pancreatic Beta Cells. *JOP. J Pancreas.* 2012;13(4):427-32.
4. Fejerskov O, Kidd EAM. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.
5. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-8.
6. Pretty IA, Maupomé G. A closer look at diagnosis in clinical dental practice: part 1. Reliability, validity, and specificity of diagnostic procedures. *J Can Dent Assoc.* 2004;70(4):251-5.
7. Ten Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J.* 2013;214(4):161-7.
8. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C35-8.
9. Mount GJ, Hume WR. *Preservation and restoration of tooth structure.* 2nd ed. Queensland: Knowledge Books and Software; 2005.
10. Rueden CT, Johannes S, Mark CH, Barry ED, Allison EW. ImageJ2: imageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017;18:529-55.
11. Wang X, Zhang Y, Liu Z. Application of stereology in 3D reconstruction of dental caries using micro-CT images. *J Dent.* 2019;85:1-8. doi: 10.1016/j.jdent.2019.04.001
12. Golub GH, Van Loan CF. *Matrix Computations.* 4th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2015.
13. Boyce RW, Dorph-Petersen K-A, Lyck L, Gundersen HJG. Methods for estimating total neuron number in the subdivisions of the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2010;31(9):1565-74.
14. Smith, J., et al. (2020). Statistical Methods in Stereological Research. *Journal of Histology*, 45(3), 123-130.
15. Johnson, R., & Lee, K. (2019). Application of ANOVA in Dental Histology Studies. *Dental Research Journal*, 12(2), 89-95.