

**PEMBUATAN GEL HIDROKSIAPATIT CANGKANG KERANG-SIMPING (*Amusium pleuronectes*) DAN PENGARUHNYA SETELAH APLIKASI DI LESI WHITE-SPOT EMAIL GIGI**

**DEVELOPMENT OF HYDROXYAPATITE ASIAN MOON SCALLOP (*Amusium pleuronectes*) GEL AND ITS EFFECT AFTER APPLICATION ON TOOTH ENAMEL WHITE-SPOT LESION**

**Rizki Amalina<sup>1</sup>, Dewi Monica<sup>2</sup>, Anggun Feranisa<sup>1</sup>, Firda Yanuar Syafaat<sup>3</sup>, Mona Sari<sup>3</sup>,  
Yusril Yusuf<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>) Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Islam Sultan Agung

<sup>2</sup>) Mahasiswa Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Islam Sultan Agung

<sup>3</sup>) Departemen Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada

Corresponding Author: rizkiamalina@unissula.ac.id

**ABSTRAK**

Masalah kesehatan gigi tertinggi di Indonesia adalah karies yaitu rusaknya jaringan keras gigi. Pencegahan karies dapat dilakukan dengan meningkatkan remineralisasi. Cangkang kerang-simping merupakan limbah industri kaya kalsium yang dapat menjadi prekursor hidroksiapatit yaitu kristal penyusun gigi. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis gel hidroksiapatit dari cangkang kerang-simping dan mengetahui pengaruh gel hidroksiapatit terhadap remineralisasi email gigi. Metode penelitian merupakan eksperimental laboratoris 2 tahap. Pertama adalah sintesis hidroksiapatit dan evaluasi fisikokimia menggunakan SEM-EDX dan XRD. Hidroksiapatit kemudian dibuat menjadi sediaan gel dan diuji secara organoleptik. Tahap kedua adalah penelitian *pre* dan *post-test control group design* menggunakan 16 sampel gigi premolar satu rahang atas post ekstraksi yang terbagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok gel hidroksiapatit 20%, dan kelompok kontrol. Uji kekerasan email gigi menggunakan *Vickers microhardness tester* sebanyak 2 kali, yaitu sebelum dan setelah aplikasi gel. Hasil menunjukkan bahwa hidroksiapatit cangkang kerang simping berukuran nano, berbentuk granular dengan rasio molar Ca:P 3,22. Konsistensi gel hidroksiapatit homogen, sedikit berbau dan berwarna putih krem. Pada hasil uji kekerasan email terdapat perbedaan signifikan sebelum dan sesudah aplikasi ( $p < 0,05$ ) dan terdapat signifikansi perbedaan peningkatan kekerasan antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Peningkatan kekerasan email kelompok gel hidroksiapatit lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Kesimpulannya adalah gel hidroksiapatit cangkang kerang-simping berpotensi sebagai agen remineralisasi email gigi

**Kata kunci:** Cangkang kerang-simping, gel hidroksiapatit, remineralisasi email gigi

**ABSTRACT**

*Dental caries is the highest dental health problem in Indonesia which destruct dental hard tissue. Its prevention can be done by increasing remineralization. Asian moon scallop shell is a waste product containing calcium as hydroxyapatite precursor. Hydroxyapatite is a major crystal in tooth enamel. The objective of the research was to develop hydroxyapatite gel from Asian moon scallop shell, and determine its effect on email remineralization. Research method was experimental laboratory divided into 2 stage. First stage was develop hydroxyapatite gel and evaluation using SEM-EDX, XRD and organoleptic. Second stage was pre and post-test control group design using sixteen maxillary first premolar samples divided into two groups: hydroxyapatite gel 20% and control. The email surface microhardness was measured twice before and after gel application using Vickers Microhardness Tester. The result showed that hydroxyapatite was nanometer size, granular shape and molar ratio Ca:P 3,22. Hydroxyapatite gel have a homogeny consistency and looks whitish. There was significant differences microhardness before and after application ( $P < 0,05$ ) and there was significant increasement differeInces microhardness value between groups ( $P < 0,05$ ). The highest microhardness was gel hydroxyapatite group. Concluded that hydroxyapatite gel of Asian moon scallop shell has the potential as a natural remineralization agent for tooth enamel.*

**Keywords:** Asian Moon Scallop, tooth enamel remineralization, hydroxyapatite gel

## PENDAHULUAN

Masalah kesehatan gigi dan mulut yang paling sering ditemukan adalah karies gigi. Karies gigi dapat ditemui pada rongga mulut pasien, tanpa memandang umur, status sosial, dan jenis kelamin. Di Jawa Tengah, prevalensi karies mencapai 56%. Persentase karies yang tinggi dan meningkat seiring bertambahnya tahun, menjadikan karies sebagai kondisi yang harus dilakukan pencegahan sedini mungkin.<sup>1</sup>

Karies gigi adalah penyakit infeksi bakteri kronis yang merusak jaringan keras gigi.<sup>2</sup> Karies gigi dapat terjadi ketika tidak tercapainya “*oral balance*” antara asupan karbohidrat, fosfor, kalsium, dan kebersihan rongga mulut. Proses terjadinya karies gigi memerlukan waktu dan frekuensi tertentu sehingga bisa terbentuk suatu kavitas pada gigi.<sup>3</sup> Karies merupakan penyakit multifaktorial. Faktor yang mempengaruhi antara lain *host*, *agent*, *environment* dan *time* yang saling berhubungan. Faktor *host* adalah kondisi gigi terkait dengan anatomi dan struktur gigi serta kesehatan umum rongga mulut maupun sistemik individu. Faktor *agent* merupakan produk hasil metabolisme mikroorganisme penyebab karies. Faktor *environment* merupakan seluruh kondisi rongga mulut terutama kondisi saliva.<sup>4</sup> Faktor *time* yaitu intensitas dan frekuensi lamanya suasana asam hasil metabolisme mikroorganisme berkontak dengan gigi.<sup>5</sup>

Tahap pembentukan lesi awal dimulai saat saliva mencapai pH kritis email 5,5. Tahap ini ditandai dengan adanya bercak putih yang sulit dilihat dengan mata. Pada tahap ini terbentuk 4 zona dengan translusensi yang berbeda. Zona translusensi, zona gelap, zona *body* dan zona permukaan mineral, sebagai pintu masuk bakteri ke bagian gigi yang lebih dalam.<sup>2</sup> Lesi ini disebut juga dengan *white spot lesions*. Lesi ini dapat mengalami remineralisasi atau berkembang menjadi kavitas bergantung dari lingkungannya.<sup>5</sup>

Proses dinamis antara demineralisasi gigi atau penguraian mineral dan remineralisasi atau pengembalian mineral gigi dipengaruhi oleh kemampuan jumlah dan komposisi saliva atau lingkungan di sekitarnya.<sup>3</sup> Kalsium dan fosfor yang terkandung dalam saliva atau lingkungan gigi sangatlah penting untuk remineralisasi gigi.<sup>5</sup>

Kristal hidroksiapatit yang menyusun hampir keseluruhan email menyebabkan gigi menjadi tidak mudah rapuh sehingga kekerasan email bergantung pada jumlah mineral hidroksiapatit pada email.<sup>5</sup> Struktur terkecil ini ditulis dalam rumus  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Email memiliki struktur yang porus sehingga ion lain mudah berdifusi. Substitusi ion akan terjadi ketika kandungan kalsium dan fosfat di saliva atau melalui asupan eksternal terpenuhi.<sup>3</sup>

Walaupun proses remineralisasi dapat terjadi secara alamiah melalui bantuan saliva, remineralisasi dapat terjadi lebih cepat dengan meningkatkan supersaturasi kalsium dan fosfat di lingkungan rongga mulut dengan cara menambahkan bahan lain.<sup>6</sup> Cangkang kerang simping mengandung kalsium 17,23% dan fosfat 0,79%. Penelitian terkait pemanfaatan cangkang kerang-simping (*Amusium pleuronectes*) telah dilakukan yaitu membuat olahan makanan kaya kalsium.<sup>7</sup> *Amusium pleuronectes*, merupakan spesies kerang dari famili *Pectinidae* yang banyak ditemukan di laut tropis seperti Indonesia. Cangkang kerang ini mengandung 96.15% *calcium oxide* (CaO), sumber kalsium yang baik untuk sintesis biokeramik.<sup>8</sup>

Sediaan obat kumur, pasta gigi, permen dan gel dapat digunakan sebagai *carrier* bahan remineralisasi untuk meningkatkan kesehatan rongga mulut dan mencegah karies.<sup>9,10</sup> Pada penelitian ini sediaan gel dipilih karena memiliki kemampuan pelepasan bahan aktif dan juga mampu berdifusi ke jaringan.<sup>7</sup>

Sampai saat ini belum ada penelitian menggunakan gel berbahan aktif hidroksiapatit dari cangkang kerang-simping untuk remineralisasi email gigi. Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai sintesis gel hidroksiapatit cangkang kerang-simping dan mengetahui pengaruh gel hidroksiapatit terhadap remineralisasi email *white spot lesion*.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik eksperimental murni laboratoris. Penelitian dilakukan 2 tahap. Tahap pertama yaitu sintesis hidroksiapatit dan evaluasi morfologi dan elemen menggunakan SEM-EDX dan kristalinitas menggunakan XRD. Setelah itu

hidroksiapatit dibuat sediaan gel dan diuji organoleptik. Penelitian tahap dua yaitu menggunakan rancangan penelitian *pre and post-test control group*. Sampel penelitian ini yaitu 16 gigi premolar satu permanen rahang atas paska ekstraksi karena kebutuhan perawatan ortodonsi. Sampel dipilih sesuai kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditentukan yaitu bebas *white-spot*, karies, fraktur, erosi, abrasi, diskolorisasi dan atrisi. Sampel gigi dipotong di bagian *cemento-email-junction* lalu ditanam dalam kotak akrilik dan permukaannya dihaluskan. Sampel dibagi menjadi 2 kelompok yaitu perlakuan gel hidroksiapatit 20% dan gel tanpa hidroksiapatit (placebo) sebagai kelompok kontrol. Pembuatan hidroksiapatit dilakukan di Laboratorium Fisika Material FMIPA UGM, pembuatan gel dilakukan di lab Farmasi UNISSULA dan prosedur remineralisasi dilakukan di Laboratorium FKG UNISSULA.

#### a. Prosedur kerja

- **Sintesis Hidroksiapatit Cangkang Kerang-Simping**<sup>8</sup>
  - a. Cangkang kerang-simping diameter cangkang 3-4 cm, dan masih tertutup dikumpulkan dari sisa pengolahan Tempat Pelelangan Ikan Tambak Lorok, Kota Semarang.
  - b. Cangkang kerang-simping dibersihkan dengan akuades kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 1 jam.
  - c. Cangkang kerang-simping di-*ball mill* agar ukuran menjadi lebih kecil, selanjutnya dikalsinasi pada suhu 1000°C selama 5 jam.
  - d. Selanjutnya proses titrasi dan pengukuran pH campuran. Hasil suspensi direaksikan melalui metode presipitasi dengan 100 ml  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}^+$  0,3 M pada temperatur 40°C. Hasil presipitasi kemudian diendapkan selama 24 jam.
  - e. Presipitat yang terbentuk kemudian difiltrasi, dikeringkan pada suhu 110°C selama 2 jam, dan *sintering* pada suhu 1000°C selama 5 jam.
  - f. Hasil *sintering* hidroksiapatit cangkang kerang-simping dihaluskan.

#### - Evaluasi hidroksiapatit

Evaluasi morfologi hidroksiapatit dilakukan menggunakan SEM dan analisis elemen melalui analisis EDX

#### - Pembuatan Gel Hidroksiapatit

- a. Pembuatan gel dengan bahan CMC, gliserin, propilenglikol dan akuades.
- b. Gel yang telah terbentuk disimpan pada suhu ruangan selama 24 jam.
- c. Gel yang terbentuk diuji secara organoleptik meliputi homogenitas, warna dan bau

#### - Prosedur Remineralisasi

<sup>5</sup>

Sampel gigi diberi pengolesan asam fosfat 37% selama 15 detik, untuk menciptakan email *white-spot lesion* lalu dilakukan pengujian kekerasan pertama dengan *Vickers Microhardness Tester*. Sampel kemudian diberi perlakuan dengan gel hidroksiapatit cangkang kerang-simping konsentrasi 20% dan pada kelompok kontrol dua kali sehari selama 14 hari. Lalu sampel kembali diuji dengan *Vickers Microhardness Tester*.

#### b. Alat dan bahan

Bahan yang digunakan adalah larutan saline, gliserin, propilen glikol. Bahan demineralisasi asam fosfat 37%, *gelling agent* CMC-Na, suspensi alumina, akrilik *self-cure*, cat kuku.

Alat yang digunakan adalah *diamond bur* dan mikromotor, *microbrush*, *furnace*, *magnetic stirrer*, analisis morfologi dan elemen menggunakan SEM-EDX (Joel JSM-6510LA-1400, Japan). Analisis kristalinitas XRD menggunakan (PAN analytical Type X'Pert Pro, Japan), dan set alat uji kekerasan email *Vickers Microhardness Tester* ASTM E92

#### c. Etik

Penelitian ini sudah lolos kaji etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKG UNISSULA No. 220/B.1-KEPK/SA-FKG/IX/2020

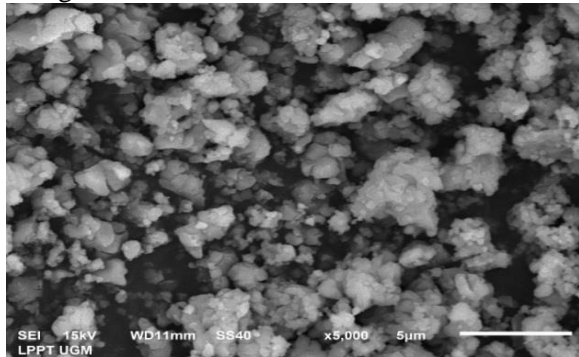
#### d. Statistik

Analisis data yang diperoleh dilakukan menggunakan analisis SPSS. Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test*. Uji beda kekerasan permukaan email antara kelompok perlakuan gel hidroksiapatit dan kontrol dilakukan dengan uji independen T. Sedangkan uji beda kekerasan

permukaan email sebelum dan sesudah aplikasi gel dilakukan dengan uji T berpasangan.

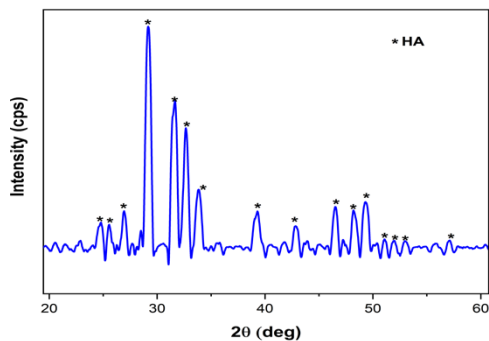
## HASIL

Hidroksiapatit yang dihasilkan dari metode ko-presipitasi memiliki gambaran sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil Karakterisasi SEM untuk Morfologi Sampel Hidroksiapatit (HA) dari Cangkang Kerang-Simping Perbesaran 5000x

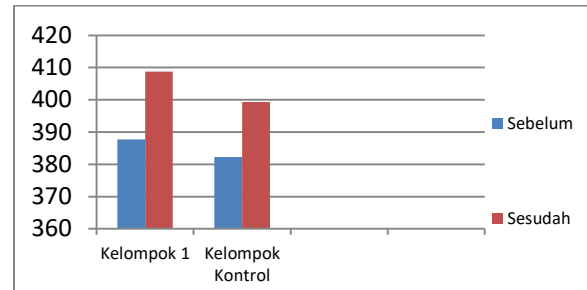
Hidroksiapatit yang didapat berbentuk granular, seragam, dan bertumpuk-tumpuk. Sedangkan hasil analisis EDX elemen Ca yaitu sebanyak 45,83% sedangkan elemen P sebanyak 10,89% sehingga didapatkan rasio molar Ca:P 3,22. Evaluasi kristalinitas didapatkan bahwa kristal hidroksiapatit yang dihasilkan berukuran  $16.42 \pm 2.03\text{nm}$  memiliki *microstrain* kecil (0.0083), parameter kisi a nya mendekati teori dan kepadatan X-ray  $8,16 \text{ g/cm}^3$  (Gambar 2).



Gambar 2. Kristalinitas hidroksiapatit

Evaluasi hasil organoleptik, gel hidroksiapatit cangkang kerang-simping memiliki konsistensi yang homogen, sedikit berbau dan memiliki warna putih krem keabuan sedangkan pada kelompok kontrol berwarna putih.

Pengukuran kekerasan email awal dilakukan sesudah proses demineralisasi dan pengukuran kekerasan email akhir setelah dilakukan perlakuan gel. Hasil uji kekerasan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Rerata kekerasan mikro email sebelum dan setelah perlakuan gel

Berdasarkan diagram di atas, dapat diamati bahwa kelompok 1 memiliki rata-rata kekerasan sebelum aplikasi sebesar  $387,75 \pm 1,426$  VHN, setelah diberi perlakuan aplikasi gel hidroksiapatit 20% meningkat sebesar  $21 \pm 1,426$  VHN menjadi  $408,75 \pm 0,453$  VHN. Kelompok kontrol memiliki nilai kekerasan sebelum aplikasi sebesar  $382,29 \pm 1,340$  VHN, dan setelah diberi perlakuan meningkat sebesar  $17 \pm 1,340$  VHN menjadi  $399,29 \pm 0,508$  VHN.

Uji normalitas pada nilai kekerasan menunjukkan nilai ( $p > 0,05$ ) yang berarti data terdistribusi normal sedangkan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* menunjukkan nilai ( $p > 0,05$ ) yang berarti data homogen dan selanjutnya dilakukan uji T berpasangan.

Hasil uji T berpasangan menunjukkan terdapat perbedaan nilai kekerasan mikro yang signifikan sebelum dan sesudah pengaplikasian gel hidroksiapatit cangkang kerang simping konsentrasi 20%, dan gel tanpa hidroksiapatit (placebo) ( $p < 0,05$ ).

Kemudian dilanjutkan dengan analisis statistik *independent T-test* untuk mengetahui perbedaan peningkatan kekerasan mikro antara kelompok kontrol dan perlakuan gel hidroksiapatit. Hasil didapat nilai p sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti bahwa ada perbedaan peningkatan kekerasan email gigi yang signifikan antara kedua kelompok.

## PEMBAHASAN

Hidroksiapatit yang disintesis dari cangkang kerang-simping memiliki bentuk yang seragam, berukuran nano dengan morfologi granular dan terlihat saling aglomerasi. Hidroksiapatit nano merupakan material bioaktif, secara langsung dapat mengisi mikropori pada lesi karies dini, yang akan beraksi sebagai panduan proses remineralisasi dengan cara menarik ion kalsium dan fosfat dalam cairan rongga mulut sehingga menstimulasi pertumbuhan kristal penyusun gigi.<sup>11</sup>

Hidroksiapatit pada penelitian ini mengandung elemen Ca yaitu sebanyak 45,83% sedangkan elemen P sebanyak 10,89% sehingga didapatkan rasio molar Ca:P 3,22. Kalsium dan fosfat merupakan komponen penting untuk menciptakan gigi yang sehat dan kuat sehingga konsentrasi kalsium dan fosfat dalam saliva dan plak memegang peran penting dalam terjadinya proses demineralisasi dan remineralisasi. Studi epidemiologis menunjukkan bukti kuat tersebut. Secara teoritis, derajat saturasi untuk email tergantung pada konsentrasi ion kalsium dan fosfat. Konsentrasi kalsium 20x lipat lebih bermakna untuk mencegah larutnya email dibanding fosfat. Eksperimental laboratorium mengindikasikan bahwa tingkat optimal derajat supersaturasi remineralisasi email bisa didapat bila rasio molar 1,6.<sup>12</sup>

Perlakuan aplikasi gel dilakukan 2x selama 14 hari karena proses remineralisasi email diperkirakan terjadi pada hari ke 14.<sup>8</sup> Proses demineralisasi untuk menciptakan email *white-spot lesion* dilakukan menggunakan asam fosfat 37% pada email gigi bagian bukal premolar satu rahang atas. Demineralisasi email mengakibatkan inti prisma dan sebagian tepi prisma menghilang. Kandungan kalsium pada gigi tersebut akan larut apabila terpapar asam dalam kurun waktu tertentu. Demineralisasi yang terjadi terus menerus akan menyebabkan kekerasan email turun.<sup>13</sup>

Setelah proses demineralisasi, kelompok 2 menunjukkan kekerasan email sebesar 387,75 VHN dan kelompok kontrol sebesar 382,29 VHN. Terdapat sedikit perbedaan kekerasan antar kelompok dikarenakan adanya perbedaan permukaan struktur anatomi gigi, misalnya yaitu

pada bentuk prisma email gigi, dan umur individu.<sup>9</sup> Proses remineralisasi dapat memperbaiki demineralisasi jika lingkungan dalam rongga mulut menyediakan konsentrasi kalsium dan fosfat yang adekuat. Deposisi mineral email dipengaruhi oleh faktor lama kontak bahan remineralisasi dengan gigi dan jenis sediaan bahan remineralisasi.<sup>5</sup>

Berdasarkan hasil penelitian ini, kedua kelompok perlakuan memiliki peningkatan kekerasan email gigi yang signifikan sesudah diberi perlakuan. Peningkatan kekerasan email gigi pada tiap kelompok setelah aplikasi karena terdapat kandungan bahan aktif pada tiap kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol, diberikan perlakuan aplikasi gel tanpa hidroksiapatit menggunakan basis gel CMC Na. CMC Na (*Carboxymethyl Cellulose Natrium*) merupakan polimer dari substitusi parsial gugus hidroksil dalam selulosa yang berikatan kuat dengan kalsium gigi dan stabil pada elektrolit.<sup>13</sup> Peningkatan kekerasan email gigi pada kelompok gel hidroksiapatit lebih tinggi dari kelompok control. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan hidroksiapatit yang merupakan kandungan mineral anorganik terbanyak pada gigi terdeposit di permukaan email gigi.<sup>14</sup>

Hidroksiapatit ukuran nano (HA nano) memicu deposit mineral pada lapisan terluar lebih baik dibandingkan dengan lesi yang dalam. Namun demikian, difusi mineral dapat terhambat bila lapisan luar telah termineralisasi lebih dulu, sehingga remineralisasi yang optimal tidak dapat tercapai. Lesi karies inisial dapat mengeras dengan deposisi hidroksiapatit pada lapisan permukaan dan lama kelamaan akan tertransfer perlahan ke bagian dalam atau pada zona gelap selama remineralisasi dalam waktu yang panjang.<sup>15</sup> Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa larutan yang mengandung 10% partikel HA nano (diameter 10–20 nm) dapat meningkatkan remineralisasi lapisan superfisial pada lesi karies inisial dengan kedalaman 20–40 µm. Namun demikian, hanya sedikit remineralisasi pada badan lesi. HA nano ukuran 20 nm dan dimensi 100–150 nm dapat meningkatkan remineralisasi pada lapisan subpermukaan lesi inisial.<sup>16</sup>

Lesi email *white-spot* aktif menunjukkan kemungkinan regresi (remineralisasi) dibandingkan dengan lesi inaktif karena mempunyai lapisan permukaan porus lebih banyak sehingga memungkinkan penetrasi ion lebih banyak untuk remineralisasi. Pendekatan lain yang dapat digunakan untuk remineralisasi yaitu menggunakan *biomimetic peptides* yang digunakan untuk stabilisasi, mengantar dan mengontrol remineralisasi.<sup>17</sup>

Keterbatasan penelitian ini yaitu hanya menggunakan uji organoleptik pada gel hidroksiapatit cangkang kerang-simping. Uji gel lain seperti uji pH, uji viskositas dan homogenitas belum dilakukan. Pada parameter remineralisasi gigi pada kelompok perlakuan hanya dilakukan evaluasi kekerasan dengan uji Vickers dan belum dilakukan uji dengan parameter remineralisasi lain.

#### SIMPULAN

Bahan hidroksiapatit dari limbah cangkang kerang-simping berpotensi digunakan sebagai bahan remineralisasi gigi alami.

#### SARAN

Perlu dilakukan uji lebih lanjut yaitu uji fisikokimia gel serta uji remineralisasi dengan parameter yang lebih beragam.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada FKG UNISSULA sebagai penyandang/sumber dana penelitian

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI. Riset Kesehatan Dasar. 2018. Jakarta.
2. Lamont, A. Oral microbiology and immunology. 2nd ed. Washington: ASM Press; 2014.
3. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd, E. Dental caries: The disease and its clinical management. 3rd ed. Oxford; Wiley Blackwell; 2015.
4. Featherstone, JDB. Dental caries: A dynamic caries process. *Aus Dent J*. 2008;53:286-291
5. Amalina R, Soekanto SA, Gunawan HA,

Sahlan M. Analysis of CPP-ACP complex in combination with propolis to remineralize email. *J Int Dent Med Res*. 2017;10(Special issue):814-819.

6. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides — mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):41-47.
7. Agustini TW, Ratnawati SE, Wibowo BA, Hutabarat J. Pemanfaatan cangkang kerang simping (*Amusium pleuronectes*) sebagai sumber kalsium pada produk ekstrudat. *J Pengolah Has Perikan Indones*. 2011;14(2):134-142.
8. Syafaat FY, Yusuf Y. Influence of Ca/P concentration on hydroxyapatite (HAP) from Asian moon scallop shell (*Amusium pleuronectes*). *Int J Nanoelectron Mater*. 2019;12(3):357-362.
9. Franca JR, De Luca MP, Ribeiro TG, et al. Propolis-based chitosan varnish: Drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:1-11.
10. Nongonierma AB, Fitzgerald RJ. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Res*. 2012;46:234-267.
11. Amaechi BT. Remineralization therapies for initial caries lesions. *Curr Oral Heal Reports*. 2015;2(2):95-101.
12. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of email: A review of the literature. *J Dent*. 2014;42 Suppl 1:S12-S20.
13. Rubai D, Mardiyantoro F. Pemanfaatan kalsium pada limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dalam remineralisasi email gigi sebagai upaya pencegahan karies [Bachelor thesis]. Malang: Universitas Brawijaya; 2017.
14. Zuliana D. Pengaruh aplikasi substrat tulang ikan bandeng (*Chanos chanos*) terhadap kekerasan email gigi [Bachelor thesis]. Semarang: Universitas Islam Sultan Agung; 2019.
15. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Marília AR, Magalhães AC. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine email and dentin submitted to a pH cycling

- model. *BDJ*. 2013;24(3):273-278.
16. Memarpour M, Shafiei F, Rafiee A, Soltani M, Dashti MH. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on enamel remineralization and estimation of fissure sealant bond strength to remineralized tooth surfaces: An in vitro study. *BMC Oral Health*. 2019;19(92):1-14.
  17. Tyagi SP, Garg P, Sinha DJ, Singh UP. An update on remineralizing agents. *J Interdiscip Dent*. 2013;3(3):151-158.