

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk di Indonesia dan kesadaran masyarakat terhadap pentingnya gizi yang berguna untuk meningkatkan kualitas hidupnya sehingga sumber gizi seperti protein juga berkembang setiap tahunnya (Hanni et al., 2022). Salah satu sumber protein hewani yang banyak dikonsumsi masyarakat yaitu daging ayam karena harganya yang relatif murah, mengandung protein yang tinggi, rendah lemak, cita rasa yang dapat diterima oleh semua umur, dan mudah diolah (Jannah, 2022). Ayam ras pedaging (broiler) merupakan jenis ayam yang laju pertumbuhannya sangat cepat karena ayam broiler dapat dipanen saat umur 5 minggu (Umam et al., 2014).

Berdasarkan data, Indonesia dari tahun 2016-2020 menduduki peringkat keenam di dunia dalam memproduksi ayam broiler dan menduduki peringkat pertama di Asia Tenggara (Widaningsih, 2022). Total populasi ayam broiler di Indonesia pada tahun 2020 mencapai 2,9 miliar ekor, kemudian tahun 2021 menurun menjadi 2,88 miliar ekor, dan pada tahun 2022 mencapai 3,16 miliar ekor. Populasi ayam broiler pada salah satu provinsi di Indonesia yaitu Sulawesi Selatan selalu meningkat 3 tahun berturut-turut yaitu pada tahun 2020 mencapai 78,9 juta ekor, tahun 2021 mencapai 92,9 juta ekor, dan tahun 2022 mencapai 111,3 juta ekor (Munawar et al., 2022).

Tubuh ayam tentu memiliki tulang sebagai penopang tubuh, dimana persentase tulang ayam sekitar 22-31% dari bobot ayam (Patriani, 2019). Pada kehidupan masyarakat, tulang ayam hanya menjadi limbah yang pemanfaatannya masih kurang (Amalia et al., 2017). Padahal menurut Ferriansyah dan Hadiantoro (2021), tulang ayam dapat dijadikan peluang dalam industri sebagai bentuk dari pengurangan limbah.

Tulang ayam mengandung komponen utama berupa kalsium fosfat 57,35%, kalsium karbonat 3,85%, dan kolagen 33,3% (Fasya et al., 2018). Kandungan kalsium karbonat dalam tulang ayam tersebut dapat dijadikan sebagai bahan dasar sintesis hidroksiapatit (Wadu et al., 2018). Ferriansyah dan Hadiantoro (2021), juga menyatakan bahwa tulang ayam memiliki kandungan garam yang terdiri dari kalsium karbonat dan kalsium fosfat yang merupakan pembentuk hidroksiapatit. Beberapa penelitian juga telah menyintesis hidroksiapatit dari tulang ayam. Peneliti yang telah menyintesis hidroksiapatit dari tulang ayam yaitu Islamillennio dan Irfa'i (2023) yang mengkalsinasi tulang ayam pada suhu 800 °C selama 6 jam, kemudian dilakukan sintesis hidroksiapatit menggunakan metode presipitasi dari tulang ayam hasil kalsinasi tersebut.

Hidroksiapatit merupakan material biokeramik yang mengandung unsur kalsium dan fosfat (Islamillennio dan Irfa'i, 2023). Hidroksiapatit dapat disintesis dari bahan alam yang banyak mengandung kalsium dan fosfor (Gintu et al., 2023). Bahan alam yang dapat digunakan selain tulang ayam diantaranya seperti batu kapur (Insiyah dan Cahyaningrum, 2019), cangkang kepiting (Supangat dan Cahyaningrum, 2017), cangkang kerang hijau (Rochmanto dan Irfai, 2023), cangkang telur ayam ras (Puspita dan Cahyaningrum, 2017), tulang ikan baung (Akbar et al., 2021), dan tulang sapi (Afifah dan Cahyaningrum, 2020). Hidroksiapatit dapat disintesis melalui beberapa metode diantaranya yaitu metode basah pengendapan (presipitasi), sol gel, dan hidrotermal (Ranamanggala et al., 2020).

Di Indonesia, hidroksiapatit masih didapatkan dengan mengimpor dari luar negeri sehingga harga hidroksiapatit di dalam negeri melambung tinggi (Amrullah dan Irfa'i, 2023). Padahal, hidroksiapatit banyak dimanfaatkan dalam bidang medis seperti penambalan gigi dan pembuatan gigi palsu (Wadu et al., 2018). Hidroksiapatit juga berguna sebagai agen antibakteri dan remineralisasi gigi (Akbar dan Cahyaningrum, 2022). Hal tersebut karena hidroksiapatit memiliki ukuran, morfologi, komposisi kimia, dan kristalinitas yang sebanding dengan gigi sehingga hidroksiapatit dapat mereminalisasi email. Nanohidroksiapatit dengan konsentrasi 10% optimal untuk remineralisasi karies email dini dengan cara kristal hidroksiapatit menembus masuk ke dalam tubulus dentin dan mengisi saluran akar gigi sehingga dapat menutup tubulus yang terbuka (Rahayu, 2013).

Proses remineralisasi email gigi sangat penting karena jika gigi terus terjadi demineralisasi, maka gigi dapat mengalami karies gigi. Karies gigi merupakan penyakit pada jaringan keras gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme yang membuat email dan dentin mengalami demineralisasi (Twinasari dan Utomo, 2019). Karies gigi dapat menyebabkan rasa sakit, sulit tidur dan makan sehingga membuat turunnya indeks massa tubuh, serta biaya yang dikeluarkan untuk mengobati karies yang parah lebih mahal dibandingkan mengobati lesi awal (Nurwati et al., 2019). Karies gigi juga membuat gigi menjadi keropos, berlubang, dan patah (Widayati, 2014). Berdasarkan data KEMENKES RI (2019), prevalensi karies gigi di Indonesia yaitu 88,8% dengan kecenderungan prevalensi karies di atas 70% pada semua kelompok umur (Sakti, 2019).

Tanda-tanda awal terbentuknya karies yaitu adanya lesi yang bercak putih (*white spot lesion*) (Twinasari dan Utomo, 2019). Lesi karies terbentuk jika bakteri yang memproduksi asam menciptakan lingkungan asam pada rongga mulut yaitu berada pada pH 5,5 sehingga menyebabkan demineralisasi gigi (Prisinda et al., 2017). Beberapa produk untuk remineralisasi gigi dari hidroksiapatit telah dibuat untuk meningkatkan kesehatan rongga mulut dan mencegah karies diantaranya yaitu pasta gigi dan gel gigi (Amalina et al., 2021).

Amalina et al. (2021), telah menyintesis hidroksiapatit untuk dijadikan gel gigi yang dibuat dari limbah cangkang kerang simping menggunakan metode presipitasi, hasilnya hidroksiapatit konsentrasi 20% berpotensi sebagai bahan aktif dalam proses pembuatan gel untuk remineralisasi gigi yang dilihat dari peningkatan kekerasan email gigi setelah pengolesan gel. Reformisa (2022), melakukan penelitian dengan membandingkan pasta dengan gel dari bahan aktif hidroksiapatit, hasilnya sediaan gel memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan sediaan pasta. Menurut Rinaldi et al. (2021), keuntungan sediaan gel dibandingkan sediaan topikal lain yaitu daya lekatnya tinggi, mudah dicuci dengan air, tidak menyumbat pori-pori gigi, pelepasan bahan aktif dan penyebarannya baik.

Berdasarkan hal-hal di atas, maka penelitian ini dilakukan apalagi saat ini belum ada penelitian mengenai gel berbahan aktif hidroksiapatit dari tulang ayam broiler untuk remineralisasi email gigi sehingga peneliti tertarik untuk membuat gel gigi tersebut menggunakan metode sol gel untuk menyintesis hidroksiapatit karena metode ini cukup sederhana, proses reaksi terjadi pada suhu yang termasuk rendah, kemampuan dalam menghasilkan partikel berukuran nanometer, dan menghasilkan produk dengan kemurnian yang tinggi (Luckita et al., 2018). Selain itu, belum ada penelitian yang menyintesis hidroksiapatit dari tulang ayam broiler menggunakan metode sol gel.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. bagaimana potensi limbah tulang ayam broiler sebagai bahan baku sintesis hidroksiapatit?
2. bagaimana karakteristik hidroksiapatit dari tulang ayam broiler?
3. bagaimana pengaruh hidroksiapatit di dalam gel untuk remineralisasi email gigi manusia?
4. bagaimana konsentrasi hidroksiapatit di dalam gel yang optimal untuk remineralisasi email gigi manusia?
5. bagaimana kualitas gel hidroksiapatit dalam waktu penyimpanan selama 14 hari?

## **1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Maksud dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui dan mempelajari cara mensintesis hidroksiapatit dari tulang ayam broiler yang digunakan sebagai bahan dasar gel gigi untuk remineralisasi email gigi manusia.

### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. memanfaatkan limbah tulang ayam broiler sebagai bahan baku sintesis hidroksiapatit.
2. menentukan karakteristik hidroksiapatit dari tulang ayam broiler.
3. menentukan pengaruh hidroksiapatit di dalam gel untuk remineralisasi email gigi manusia.
4. menentukan konsentrasi hidroksiapatit di dalam gel yang optimal untuk remineralisasi email gigi manusia.
5. menentukan kualitas gel hidroksiapatit dalam waktu penyimpanan selama 14 hari.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini yaitu memberikan informasi kepada masyarakat mengenai potensi limbah tulang ayam broiler sebagai bahan baku sintesis hidroksiapatit yang dapat dimanfaatkan dalam pembuatan gel gigi untuk remineralisasi email gigi manusia sebagai upaya pencegah terbentuknya karies gigi.

## **BAB II METODE PENELITIAN**

### **2.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu limbah tulang paha ayam broiler, NaOH, etanol 96%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, kertas saring *Whatman* no. 42, Na-CMC, metil paraben, gliserin, propilenglikol, akuabides, akuades, gigi manusia, resin akrilik *selfcure*, dan amplas tipe 500.

### **2.2 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, tanur, *hot plate magnetic stirrer*, *oven*, *vickers hardness tester*, FTIR, XRD, *microbrush*, *stopwatch*, beban timbangan, pH meter, dan viskometer.

### **2.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan mulai bulan Juni-November 2024 di Laboratorium Kimia Anorganik, Laboratorium Kimia Organik, dan Laboratorium Kimia Terpadu Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar, Laboratorium Pertambangan Departemen Teknik Pertambangan Fakultas Teknik Universitas Hasanuddin Gowa, serta Laboratorium Mekanik Jurusan Teknik Mesin Politeknik Negeri Ujung Pandang Makassar. Sampel limbah tulang ayam broiler diambil di Pasar Modern Minasa Maupa Kabupaten Gowa dan sampel gigi premolar pertama rahang bawah manusia diambil di Klinik Gigi.

### **2.4 Prosedur Penelitian**

#### **2.4.1 Preparasi Tulang Ayam Broiler**

Tulang ayam broiler bagian paha sebanyak 1 kg dicuci menggunakan akuades, kemudian direbus hingga akuades mendidih, lalu dibersihkan daging yang masih menempel pada tulang. Setelah dibersihkan, tulang ayam broiler direbus pada suhu 80 °C selama 30 menit, kemudian tulang ayam ditiriskan dan dijemur di bawah sinar matahari selama 3 jam. Tulang ayam broiler dipotong dengan ukuran 2-5 cm dan dihilangkan sumsum dalam tulang, kemudian tulang ayam direndam di dalam larutan NaOH 4% dengan perbandingan 1:4 (tulang ayam : NaOH) selama 120 jam (larutan NaOH diganti setiap 24 jam). Setelah itu, tulang ayam broiler diangkat dan dicuci menggunakan akuabides hingga pH netral. Tulang ayam broiler yang telah dinetralisasi dikeringkan dalam *oven* pada suhu 80 °C selama 24 jam, kemudian digerus hingga menjadi serbuk, lalu diayak menggunakan ayakan 100 *mesh*. Setelah itu, serbuk tulang ayam broiler dianalisis komposisinya menggunakan FTIR dan XRD.

#### **2.4.2 Kalsinasi Tulang Ayam Broiler**

Serbuk tulang ayam broiler yang telah dianalisis, kemudian dilakukan kalsinasi dengan cara serbuk dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 850 °C selama 6 jam. Hasil kalsinasi diayak menggunakan ayakan 100 *mesh*. Serbuk yang telah dihasilkan, dianalisis menggunakan FTIR dan XRD.

### 2.4.3 Sintesis Hidroksiapatit

Serbuk CaO hasil kalsinasi sebanyak 4,676 g dan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% sebanyak 3,3712 mL masing-masing ditambahkan dengan etanol 96% hingga 50 mL. Larutan CaO 1,67 M ditetesi larutan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M menggunakan buret secara perlahan sambil larutan dipanaskan pada suhu 37 °C dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 300 rpm selama 2 jam (kondisi pH dijaga pada pH 10 dengan cara ditetesi larutan NH<sub>4</sub>OH 2 M). Setelah itu, larutan campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air pada suhu 60 °C selama 1 jam, kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah didiamkan, larutan campuran didekantasi dan gel yang diperoleh diaduk pada suhu 60 °C hingga diperoleh fase gel yang memadat. Gel yang telah memadat disaring menggunakan corong *Buchner* dan dicuci menggunakan akuabides hingga pH netral. Setelah itu, gel dioven pada suhu 60 °C selama 24 jam, kemudian disintering dengan cara dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 850 °C selama 6 jam. Serbuk berwarna putih yang telah terbentuk selanjutnya dikarakterisasi menggunakan FTIR dan XRD.

### 2.4.4 Karakterisasi Hidroksiapatit

#### 2.4.4.1 Karakterisasi dengan FTIR

Serbuk hidroksiapatit sebanyak 2 mg dicampur dengan 200 mg KBr, kemudian dicetak menjadi pelet. Setelah itu, analisis spektrum FTIR dilakukan pada kisaran bilangan gelombang dari 4000-300 cm<sup>-1</sup>. Gugus fungsi yang terdapat pada hidroksiapatit dari penelitian-penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Gugus-gugus fungsi hidroksiapatit

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) (Gandou et al., 2015)	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) (Lugo et al., 2017)	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) (Raya et al., 2015)	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) (Haris et al., 2016)
OH <sup>-</sup>	3571	3568	3570,24 3427,51	3571,36
	632	631		
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		2079		
		2002		
	1089	1093	1120,64	1077,33
	1047	1062	1091,71	
	962	1036	1043,49	
	873	964	993,34	983,74
	602	605	877,61	
	569	605	603,72	602,78
	434	564	565,14	
	471		467,76	
		370,33		
		1654,92		
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>				1546,98
	1450		1458,18	1460,18
	1413		1421,54	
				880,54

#### 2.4.4.2 Karakterisasi dengan XRD (Muttaqin et al., 2023; Hartati et al., 2014)

Serbuk hidroksiapatit sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam *holder* yang berukuran (2x2) cm<sup>2</sup> pada difraktometer. Sudut awal diambil pada 10° dan sudut akhir pada 70° dengan kecepatan pembacaan 2° per menit. Hasil Analisis yang diperoleh dibandingkan dengan kartu ICDD dari *software HighScore Plus* untuk menentukan komponen yang ada di dalam sampel. Kartu ICDD yang digunakan yaitu ICDD No. 01-084-1998 (hidroksiapatit), ICDD No. 00-009-0169 ( $\beta$ -trikalsium fosfat), ICDD No. 00-035-0180 (karbonat apatit), ICDD No. 00-005-0586 (CaCO<sub>3</sub>), ICDD No. 01-084-1263 (Ca(OH)<sub>2</sub>), dan ICDD No. 00-037-1497 (CaO). Penggunaan XRD juga dapat digunakan untuk menentukan %kristalinitas dan diameter kisi sampel. Penentuan %kristalinitas hidroksiapatit dapat dilakukan menggunakan metode Landi, sedangkan diameter kisi dapat dilakukan menggunakan persamaan Debye Scherrer.

Persamaan Landi:

$$X_c = \left[ 1 - \frac{V_{(112-300)}}{I_{300}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

dimana  $X_c$  = %kristalinitas,  $V_{112-300}$  = puncak terendah antara puncak hasil difraksi bidang 112 dan bidang 300, dan  $I_{300}$  = intensitas puncak yang dihasilkan oleh bidang 300.

Persamaan Debye Scherrer:

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{\text{rad}} \cdot \cos \theta} \quad (2)$$

dimana  $D$  = diameter kisi kristal,  $k$  = konstanta (0,98),  $\lambda$  = panjang gelombang  $K\alpha$  yang digunakan (1,5406 Å),  $\beta_{\text{rad}}$  = FWHM, dan  $\theta$  = posisi puncak.

#### 2.4.5 Pembuatan Gel Hidroksiapatit

Serbuk Na-CMC sebanyak 1 g ditambahkan 10 g akuabides panas dengan suhu 70 °C, kemudian diaduk secara konstan hingga homogen. Setelah itu, basis gel ditambahkan 0,1 g metil paraben yang telah dilarutkan dengan 5 g akuabides, kemudian ditambahkan gliserin sebanyak 5 g dan propilenglikol sebanyak 2,5 g sambil diaduk hingga homogen. Penambahan serbuk hidroksiapatit divariasikan dengan konsentrasi 22%, 26%, dan 30% ke dalam basis gel, kemudian ditambahkan akuabides hingga mencapai 50 g dan diaduk hingga homogen. Formulasi gel hidroksiapatit dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Formulasi gel hidroksiapatit

Bahan	Konsentrasi (%b/b)				Kegunaan
	F0	F1	F2	F3	
Na-CMC	2,0	2,0	2,0	2,0	<i>Gelling agent</i>
Hidroksiapatit	0,0	22,0	26,0	30,0	Bahan aktif
Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
Gliserin	10,0	10,0	10,0	10,0	Humektan
Propilenglikol	5,0	5,0	5,0	5,0	Humektan
Akuabides	Add 100	Add 100	Add 100	Add 100	Pelarut

## **2.4.6 Uji Mutu Fisik Sediaan**

### **2.4.6.1 Uji Organoleptik**

Gel hidroksiapatit yang telah selesai dibuat diamati bentuk, warna, dan aroma dari gel tersebut secara objektif. Uji organoleptik tersebut dilakukan pada 15 orang panelis, dimana panelis diberikan gel hidroksiapatit, kemudian panelis diberikan kuisioner dan diisi sesuai pengamatannya. Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

### **2.4.6.2 Uji Homogenitas**

Gel hidroksiapatit dioleskan sebanyak 0,1 g pada sekeping kaca atau alat transparan, kemudian diamati di tempat terang. Hasil uji yang baik yaitu tidak terlihat adanya gumpalan dan partikel yang terpisah, serta tidak ada benda asing. Uji homogenitas dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

### **2.4.6.3 Uji pH**

Gel hidroksiapatit ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian diencerkan menggunakan akuades sebanyak 50 mL di dalam gelas kimia. Larutan diukur dengan dicelupkan kertas pH *universal*, kemudian dicocokkan kertas pH yang telah berubah warna di standar warna pH *universal*. Hasil uji yang baik diperoleh pH antara 4,5-10,5. Uji pH dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

### **2.4.6.4 Uji Viskositas**

Gel hidroksiapatit dimasukkan ke dalam *chamber* viskometer, kemudian bagian atas *spindle* dipasang pada viskometer dan bagian bawah dicelupkan pada gel hingga tercelup seluruhnya. Setelah itu, viskometer dinyalakan, kemudian dilihat viskositas gel saat jarum petunjuk pada skala tertentu telah stabil. Hasil uji yang baik diperoleh kekentalan antara 200-500 dPas. Uji viskositas dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

### **2.4.6.5 Uji Daya Sebar**

Gel hidroksiapatit diletakkan sebanyak 0,5 g di tengah cawan petri (kaca bulat berskala), kemudian ditutup menggunakan cawan petri lain. Setelah itu, beban sebesar 150 g diletakkan di atas cawan petri, kemudian diukur diameternya setelah 1 menit. Pengukuran diameter dilakukan menggunakan penggaris pada 3 titik yang berbeda. Hasil uji yang baik diperoleh daya sebar sediaan antara 2,61-5,32 cm. Daya sebar tidak boleh terlalu tinggi karena dapat membuat sediaan gel terlalu encer yang membuatnya mudah meluruh sehingga sulit diaplikasikan ke gigi. Uji daya sebar dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

### **2.4.6.6 Uji Daya Lekat**

Gel hidroksiapatit diletakkan sebanyak 0,25 g di antara kaca preparat pada alat uji daya lekat, kemudian diletakkan beban 1 kg di atas kaca preparat yang menutupi sediaan gel selama 5 menit. Setelah itu, beban 80 g digunakan untuk melepaskan kaca preparat dari sediaan gel. *Stopwatch* dinyalakan hingga kaca preparat terlepas dan dicatat waktu yang dibutuhkan kaca preparat terlepas. Hasil uji yang baik diperoleh daya lekat yang mampu bertahan lebih dari 4 detik. Daya lekat yang semakin tinggi menunjukkan konsistensi

sediaan lebih padat dan lebih baik dalam melepaskan bahan aktif sehingga daya serap pada permukaan email gigi akan semakin maksimal, tetapi memiliki penyebaran yang kurang baik. Uji daya lekat dilakukan pada hari ke-1 dan ke-14.

#### **2.4.6.7 Uji Remineralisasi Gigi**

Sampel sebanyak 8 gigi premolar pertama rahang bawah manusia yang bersih dan tidak memiliki kerusakan dibagi menjadi 4 kelompok. Sampel gigi dibersihkan menggunakan sikat gigi dan air mengalir, kemudian gigi dilap hingga kering. Setelah itu, gigi ditanamkan ke dalam resin akrilik *selfcure* yang berdiameter dan tinggi 1,5 cm × 1,5 cm dengan permukaan gigi bagian bukal menghadap ke atas. Sampel gigi diampas menggunakan amplas tipe 500 sambil dialiri air mengalir hingga permukaan gigi datar dan halus, kemudian gigi dilap hingga kering.

Sampel gigi diukur kekerasan awalnya menggunakan *vickers hardness tester*. Setelah dilakukan uji kekerasan awal, sampel gigi dioleskan larutan asam fosfat 37% selama 15 detik, kemudian dibilas dengan akuabides dan dikeringkan menggunakan *cotton pellet*. Setelah menciptakan *white spot lesion*, sampel diuji lagi kekerasannya menggunakan *vickers hardness tester*. Gel hidroksiapatit diaplikasikan selama 14 hari dengan cara dioleskan menggunakan *microbrush* ke sampel gigi selama 5 menit dan dilakukan 3 kali sehari dengan selang waktu 6 jam. Setelah 5 menit, gigi dibilas dan dilap, kemudian gigi disimpan dalam wadah yang berisi akuabides pada suhu ruang (akuabides diganti setiap 24 jam sekali). Setelah gel diaplikasikan selama 14 hari, sampel gigi diuji kekerasannya menggunakan *vickers hardness tester* pada hari ke-14.