

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karies gigi adalah penyakit multifaktorial disebabkan karena interaksi empat faktor utama yaitu mikroorganisme, substrat, host dan waktu. Berdasarkan laporan status kesehatan mulut (WHO, 2023) diperkirakan penyakit mulut mempengaruhi hampir 3,5 milyar orang di seluruh dunia. Secara global, diperkirakan sekitar 2 milyar orang menderita karies gigi permanen dan 514 juta anak menderita karies gigi sulung. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar 2018, masalah kesehatan gigi dan mulut di Indonesia menunjukkan prevalensi yang cukup tinggi yaitu 57,6% dan prevalensi karies gigi sebanyak 88,8%. Prevalensi karies gigi di provinsi Sulawesi Selatan yaitu sebesar 55,54% (*Laporan Nasional Riskesdas 2018*, 2018).

Karies dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara faktor protektif dan patologis. Metabolisme karbohidrat oleh bakteri menyebabkan terjadi produksi asam yang menurunkan pH di sekitarnya. Ketika pH turun, kelarutan email akan meningkat secara signifikan sehingga terjadi demineralisasi (Philip, 2019; Kolumban *et al.*, 2021; Revankar *et al.*, 2021). Faktor protektif dapat meningkatkan remineralisasi sedangkan faktor patologis menyebabkan demineralisasi (Ritter, Boushell and Walter, 2019; Revankar *et al.*, 2021). Faktor patologis yaitu bakteri kariogenik, karbohidrat yang terfermentasi dan disfungsi saliva. Faktor protektif yaitu paparan fluoride pada gigi, agen antibakteri, ion remineralisasi, saliva yang cukup, membatasi frekuensi konsumsi karbohidrat, memilih makanan yang kurang kariogenik, menjaga kebersihan mulut dengan baik serta melakukan pemeriksaan dan perawatan gigi secara teratur (Clark, Keels and Slayton, 2020; Sahiti *et al.*, 2020).

Gigi akan selalu mengalami proses demineralisasi dan remineralisasi yang merupakan proses fisiologis (Arifa, Ephraim and Rajamani, 2019). Ketika terjadi ketidakseimbangan antara demineralisasi dan remineralisasi maka proses demineralisasi akan terus berlanjut dan gigi akhirnya menjadi karies. Proses demineralisasi dimulai dengan terjadi pelarutan komponen matriks organik dan anorganik serta pelepasan ikatan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion fosfat (PO_4^{3-}) dari hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) sehingga terbentuk mikroporositas dan berkurangnya kekerasan mikro pada permukaan email (Nugroho *et al.*, 2019). Saliva manusia mengandung ion kalsium dan fosfat sehingga mampu remineralisasi email. Namun proses remineralisasi ini merupakan proses yang lama serta membutuhkan ion kalsium dan fosfat dalam jumlah yang banyak agar kondisi jenuh dapat terpenuhi sehingga dibutuhkan bahan yang dapat membantu terjadinya proses remineralisasi lebih cepat (Swarup and Rao, 2012; Amalina *et al.*, 2021; Revankar *et al.*, 2021).

Berbagai bahan remineralisasi telah dikenalkan untuk menahan atau menghentikan laju pertumbuhan karies. Fluoride adalah bahan yang paling sering diaplikasikan hingga saat ini. Fluoride masuk ke dalam email dan berikatan dengan kalsium fosfat menghasilkan fluorapatit yang lebih keras dan lebih sulit larut dibandingkan dengan hidroksiapatit. Kemampuan fluoride untuk remineralisasi tergantung pada ketersediaan ion kalsium dan fosfat dalam saliva atau plak sehingga bisa menjadi salah satu batasan terutama pada pasien dengan hiposalivasi (Chhabra and Chhabra, 2018). Selain fluoride, *Casein PhosphoPeptide-Amorphous Calcium Phosphat* adalah agen remineralisasi lain yang terbukti mampu remineralisasi gigi. Jumlah kehilangan kalsium dari plak selama penggunaan CPP-ACP akan menurun dan memungkinkan kembalinya konsentrasi kalsium awal (Coceska *et al.*, 2016; Revankar *et al.*, 2021).

Indonesia adalah negara yang memiliki teritorial berupa laut yang lebih luas dari daratan dengan produksi hasil laut yang besar. Sulawesi Selatan adalah salah satu provinsi yang dikenal dengan produksi hasil lautnya. Dengan produksi hasil laut yang besar, masalah limbah produksi hasil laut yang dapat mencemari lingkungan tidak dapat dihindarkan. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan limbah yang sudah tidak digunakan.

Beberapa penelitian tentang sumber alam sebagai bahan baku antara lain cangkang kerang, cangkang siput, cangkang telur, tulang ikan dan sisik ikan telah dilakukan. Salah satu produksi hasil laut yang besar di provinsi Sulawesi Selatan yaitu cangkang kerang hijau yang pada tahun 2022 memiliki hasil produksi sebanyak 24,1 ton (Saragih, Pamungkas and Noviyanto, 2020; *Produksi Laut Tahunan menurut Jenis Ikan dan Kabupaten di Sulawesi Selatan*, 2023). Cangkang kerang hijau tersusun atas kalsium karbonat, kalsium fosfat, $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, Ca_3S , dan kalsium aktif. Cangkang kerang hijau dapat dilakukan proses pengolahan untuk dibuat ekstrak yang menghasilkan hidroksiapatit secara sintetik. Hidroksiapatit terdiri dari kalsium fosfat yang memiliki sifat bioaktif dan osteo-konduktif. Ion kalsium dan fosfat dapat menghambat proses dekomposisi hidroksiapatit dan menyebabkan rekonstruksi kristal hidroksiapatit. Bahan ini dapat digunakan sebagai salah satu agen remineralisasi pada gigi ketika terjadi demineralisasi. (Nugroho *et al.*, 2019).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) terhadap kekerasan mikro dan rasio kalsium fosfat pada remineralisasi gigi permanen muda.

1.2. Teori

1.2.1. Email Gigi

Email adalah struktur yang menutupi seluruh mahkota klinis gigi. Pembentukan email, amelogenesis, dilakukan oleh sel bernama ameloblast. Email berasal dari lapisan benih embrio dikenal sebagai ektoderm. Email memiliki variasi ketebalan berbeda-beda di berbagai area dan melekat pada dentin. Ketebalan email pada area oklusal dan insisal (2,5 mm) dan akan menipis pada servikal (0,01 mm) hingga

berakhir pada cementoenamel junction (CEJ). Ketebalan juga bervariasi dari satu gigi ke gigi lainnya seperti 2 mm insisivus, 2,3-2,5 mm pada cusp premolar dan 2.5-3 mm pada cusp molar (Klimuszkó *et al.*, 2018).

Email adalah jaringan terkeras pada manusia. Secara kimia, email memiliki struktur kristal dengan tingkat mineralisasi yang tinggi. Secara struktur, email terbentuk dari jutaan enamel rods (disebut juga prisma) yang terikat oleh protein dan memiliki celah mikro di antara prismanya. Prisma ini terdiri dari hidroksiapatit (HA) yang dalam bentuk kisi kristal yang merupakan mineral paling besar (90-92% dari volumenya) sedangkan mineral lain dalam jumlah kecil termasuk protein matriks organik (1-2%) dan air (4-12%). Hidroksiapatit murni terdiri dari 57% ion fosfor, 40% kalsium dan 2% hidroksil (Klimuszkó *et al.*, 2018; Akkūç, Duruk and Keleş, 2023). Email memiliki lebih banyak kandungan anorganik (~90% kristal hidroksiapatit) dibandingkan dentin sekitar 70% dan sementum 45%. Email memiliki sedikit bahkan tidak ada kolagen dan matriks organiknya terbuat dari protein nonkolagen yaitu 90% amelogenin (Neel *et al.*, 2016; Ritter, Boushell and Walter, 2019; Grohe and Mittler, 2021). Diameter enamel rods dekat perbatasan dentin berukuran sekitar 4 µm dan sekitar 8 µm dekat permukaan. Perbedaan diameter ini menyesuaikan dengan ukuran permukaan email yang lebih besar dibandingkan dentin. (Ritter, Boushell and Walter, 2019). Email tidak memiliki kemampuan regeneratif seperti dentin karena bersifat merupakan aseluler. Email tidak dapat remineralisasi dirinya sendiri namun dibantu oleh lingkungan (Grohe and Mittler, 2021).

Email selalu berkontak dengan biofilm yang terbentuk dari komponen saliva. Biofilm terdiri dari acquired pellicle (bebas dari bakteri) dan plak. Acquired pellicle merupakan lapisan protein dengan ketebalan 1 µm antara email dan plak terdiri dari glikoprotein, mucin dan lipid. Acquired pellicle dapat mencegah difusi asam dan perpindahan ion. Plak merupakan lapisan transisi bakteri yang melekat dan berkelompok dengan kepadatan yang menurun dengan bertambahnya jarak dari permukaan gigi (Hegde, Gafoor and Devadiga, 2014; Grohe and Mittler, 2021).

Hidroksiapatit (HA)

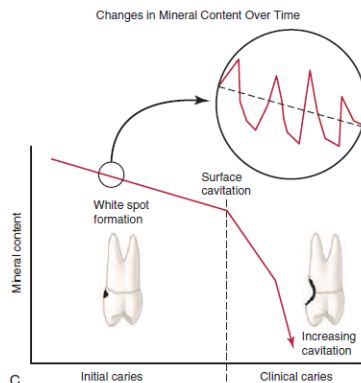
Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) adalah komponen utama tulang dan gigi manusia. HA dapat ditemukan dalam matriks gigi dan yang memberi kekakuan pada gigi (Sahiti *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2022). HA murni memiliki fase kristal kalsium fosfat yang stabil, struktur heksagonal, berat kalsium 39,68% dan berat fosfor 18% serta variabel rasio mol antara kalsium dan fosfat (Ca/P) yang ideal yaitu 1,67 atau 5/3. Pada rasio ini maka partikel HA akan memiliki ukuran yang seragam dan bentuk yang reguler. Semakin tinggi rasio kalsium fosfat maka kristalinitas, densitas dan besar kristal akan semakin tinggi. Keunggulan HA adalah berpori, bioaktif, tidak korosif dan tahan aus. HA memiliki berat 69% dari berat tulang murni dan merupakan senyawa paling stabil dalam cairan tubuh dan udara kering hingga suhu 1200°C. Kelarutan HA meningkat 10 kali seiring penurunan setiap unit pH. (Guzmán Vázquez, Piña Barba and Munguía, 2005; Sari and Yusuf, 2018; Kolumban *et al.*, 2021).

Pada gigi, kristal HA memiliki berat 70-80% dari dentin dan email. Dalam tubuh manusia, email adalah jaringan paling keras yang terdiri dari HA yang relatif besar yaitu ketebalan 25 nm, lebar 40-120 nm dan panjang 160-1000 nm. HA adalah bahan utama email yang menyaring reflektifitas cahaya yang menyebar dengan menutup pori-pori pada permukaan email, sehingga membuat tampilan email terlihat semitranslucent (Habibah, Amlani and Brizuela, 2022).

HA telah menarik banyak perhatian sebagai biomaterial karena komposisi kimianya yang mirip dengan jaringan keras manusia dan memiliki sifat biokompatibilitas, bioaktivitas, osteokonduktivitas, tidak toksik dan tidak menyebabkan inflamasi. HA umumnya digunakan dalam aplikasi ortopedi, gigi dan maksilofasial. HA adalah bahan keramik bioaktif yang mampu meremineralisasi dan dapat disintesis dari bahan yang mengandung kalsium dan fosfor oleh metode sintetik kimiawi yang kemudian disebut HA sintetik. HA dapat diperoleh dari bahan alam seperti tulang ikan, tulang sapi, terumbu karang, cangkang kerang, cangkang telur dan lainnya. HA yang dihasilkan dari sumber alam bersifat non-stoikiometri karena adanya ion lain yang terdapat pada sumber alam seperti karbon, nitrogen, besi dan elemen lainnya. Rasio kalsium fosfatnya bervariasi dari 1,2 hingga hampir 2 dalam hidroksiapatit sintetik. (Guzmán Vázquez, Piña Barba and Munguía, 2005; Sari and Yusuf, 2018; Nugroho *et al.*, 2019; Habibah, Amlani and Brizuela, 2022).

1.2.2. Demineralisasi dan Remineralisasi

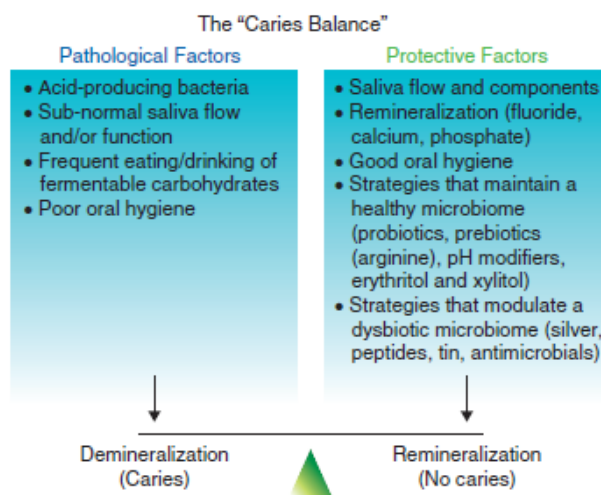
Rongga mulut memiliki pH yang netral. Beberapa bakteri dalam biofilm dapat memetabolisme karbohidrat untuk energi dan memproduksi asam. Jika kondisi asam ini bertahan dalam waktu yang lama maka akan dapat menyebabkan penurunan pH biofilm di bawah level kritis (5,5 untuk email dan 6,2 untuk dentin) dan disbiosis dalam mikrobiom. pH rendah menyebabkan kalsium dan fosfat keluar dari gigi ke biofilm dalam upaya mencapai ekuilibrium sehingga terjadi kehilangan mineral gigi atau demineralisasi. Ketika mineral larut maka, jarak antar ruang kristal akan melebar, permukaan email akan menjadi lebih lunak dan berpori. Ketika pH biofilm kembali ke netral dan konsentrasi kalsium dan fosfat yang larut pada saliva dalam kondisi jenuh daripada yang berada dalam gigi maka mineral akan masuk kembali ke email yang terdemineralisasi parsial yang disebut remineralisasi.



Gambar 1. Proses terjadinya kavitas pada gigi melalui proses demineralisasi dan remineralisasi berulang secara bergantian.

Sumber: Ritter A V, Boushell LW, Walter R Sturdevant's Art And Science Of Operative Dentistry. seventh. Elsevier. Missouri: Elsevier; 2019. p. 49

Proses demineralisasi dan remineralisasi terjadi beberapa kali sehari. Proses ini terjadi karena banyak faktor termasuk jumlah dan tipe bakteri dalam biofilm, diet, kebersihan mulut, genetik, anatomi gigi, komposisi dentin dan email, penggunaan fluoride dan agen kemoterapi lain, komposisi saliva, aliran saliva dan kapasitas buffering (Ritter, Boushell and Walter, 2019).



Gambar 2. Keseimbangan antara demineralisasi dan remineralisasi berdasarkan faktor patologis dan protektif

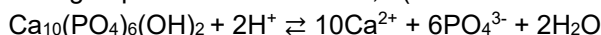
Sumber: (Ritter A V, Boushell LW, Walter R Sturdevant's Art And Science Of Operative Dentistry. seventh. Elsevier. Missouri: Elsevier; 2019. p. 42)

Demineralisasi

Demineralisasi adalah proses kerusakan email gigi di mana kandungan mineral gigi seperti kalsium, fosfat dan hidroksil larut keluar dari gigi. Dengan terjadinya demineralisasi maka kandungan mineral dalam gigi akan menurun dan kekerasan

gigi akan berkurang sehingga dibutuhkan proses remineralisasi. (Sahiti *et al.*, 2020). Demineralisasi yang berlanjut terus-menerus dapat menyebabkan terjadinya erosi dan lesi karies. Lesi karies disebabkan oleh aktivitas bakteri sedangkan erosi disebabkan oleh faktor eksternal seperti konsumsi minuman bersoda serta faktor intrinsik seperti refluks esofageal (Ritter, Boushell and Walter, 2019).

Demineralisasi disebabkan karena serangan asam yaitu asam dari makanan atau minuman dan serangan mikroba dari bakteri yang ada dalam plak sehingga terjadi penurunan pH kritis di bawah 5,5. Adanya kandungan air dalam email memfasilitasi difusi asam ke dalam dan kandungan mineral ke luar gigi. Asam menyebar masuk ke segala arah melalui acquired pellicle masuk ke dalam email (Lata, Varghese and Varughese, 2010; Grohe and Mittler, 2021). Selama terjadinya serangan asam, terjadi pelarutan komponen matriks organik dan anorganik serta pelepasan ikatan ion kalsium (Ca^{2+}) dan fosfat (PO_4^{3-}) dari hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) pada permukaan gigi. Ion H^+ diproduksi oleh metabolisme bakteri bereaksi dengan kelompok fosfat dalam email mengubah ion PO_4^{2-} menjadi ion $(\text{HPO}_4)^{2-}$ yang ketika terlanjur terbentuk tidak dapat membentuk kisi kristal kembali. Ketika hal ini terjadi secara terus menerus maka lesi karies dapat terbentuk (Neel *et al.*, 2016; Akkücü, Duruk and Keleş, 2023). Sementara itu, erosi disebabkan karena degradasi kimia tanpa keterlibatan bakteri. Erosi merupakan kombinasi dua atau lebih mekanisme serangan asam/erosi akibat makanan atau muntah berulang. Serangan asam oleh erosi terjadi lebih cepat dengan pH lebih rendah ~2-2,5 (Grohe and Mittler, 2021).



Peristiwa demineralisasi yang berulang dapat disebabkan oleh lingkungan patologis yang dominan yang menyebabkan pelarutan lokal dan kerusakan jaringan gigi yang terkalsifikasi, dikenal dengan nama karies. Demineralisasi yang berlangsung di bawah permukaan email menyebabkan permukaan kolaps sehingga terbentuk kavitas pada permukaan email. Demineralisasi dentin yang parah menghasilkan pemaparan matriks protein, yang mengalami denaturasi awalnya oleh host matriks metalloproteinase (MMPs) dan selanjutnya didegradasi oleh MMP dan protease bakteri lainnya. Demineralisasi fase anorganik (mineral dentin), dan denaturasi dan hasil degradasi fase organik (terutama kolagen dentin) menyebabkan terjadinya kavitas pada dentin. (Ritter, Boushell and Walter, 2019). Demineralisasi menyebabkan peningkatan ruang interprismatik, kandungan mineral yang menurun, perubahan orientasi kristal hidroksiapatit dan bentuk yang abnormal, peningkatan porositas email sehingga penetrabilitas lebih tinggi serta penurunan tingkat kekerasan dan resistensi terhadap fraktur serta rentan terhadap erosi dan abrasi (Lata, Varghese and Varughese, 2010; Kolumban *et al.*, 2021; Noor *et al.*, 2021).

Saat ini, demineralisasi terjadi pada anak-anak sejak kecil akibat meningkatnya karies gigi akibat tingginya kebiasaan makan karbohidrat, dan peningkatan erosi gigi karena seringnya konsumsi jus buah dan minuman berkarbonasi. Pentingnya edukasi pada orangtua tentang diet makanan anak harus dilakukan untuk mencegah terjadinya karies dan erosi gigi pada anak. Manajemen demineralisasi gigi harus berkonsentrasi pada deteksi dini dan pencegahan. Kesehatan mulut dan gigi

berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan anak (Akküç, Duruk and Keleş, 2023).

Remineralisasi

Dalam kedokteran gigi, tujuan utama perawatan adalah untuk meningkatkan jumlah gigi sehat dalam mulut sehingga perawatan protektif dan preventif menjadi tersebar luas. Metode diagnostik modern sekarang mampu mendeteksi kehilangan jaringan keras pada gigi ketika masih berada di tingkat kehilangan mineral. Dengan deteksi awal dan perawatan yang lebih cepat maka diharapkan dapat mengurangi penyakit gigi dan mulut pada anak. Salah satunya yaitu dengan cara remineralisasi (Akküç, Duruk and Keleş, 2023).

Remineralisasi adalah proses perbaikan alami mineral yang hilang dalam gigi dengan bantuan protein saliva seperti kalsium dan fosfat (Sahiti *et al.*, 2020; Grohe and Mittler, 2021). Remineralisasi dapat terjadi ketika pH rongga mulut naik ke 7 di mana kalsium (Ca^{2+}) dan fosfat (PO_4^{3-}) yang berada pada saliva jenuh/plak akan masuk ke dalam ruang kristal kosong pada struktur gigi yang telah terdemineralisasi sehingga terjadi net mineral gain. Keberadaan fluoride dalam lingkungan rongga mulut dapat mendorong penggabungan Ca^{2+} dan PO_4^{3-} ke dalam kisi kristal menjadi fluorapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3$). Walau fluoroapatit memiliki sifat yang lebih keras dan lebih sulit larut dari kristal hidroksiapatit (pH4,5), namun fluoroapatit ini hanya melekat pada permukaan email sebanyak 30 μm yang mencegah penetrasi ion ke kedalaman lesi, tidak terjadi pembentukan kristal hidroksiapatit. Deposisi cepat fluoride ini membentuk lapisan permukaan yang kuat namun resisten terhadap penetrasi ion dan kalsium fosfat yang dibutuhkan untuk membentuk kembali lesi yang dalam (Lata, Varghese and Varughese, 2010; Philip, 2019; Abdelnabi *et al.*, 2020; Grohe and Mittler, 2021).

Banyak faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya remineralisasi yaitu bentuk dan struktur gigi, jumlah dan kualitas saliva, komposisi biofilm bakteri, ion fluoride, perubahan pH menjadi lebih tinggi. Dalam kondisi sehat, saliva mampu menjadi media remineralisasi efektif untuk lesi permukaan email. Saliva dan cairan biofilm jenuh dengan ion kalsium fosfat. Saliva mengandung statherin, peptida kaya proline yang bisa menstabilkan ion kalsium dan fosfat dan mencegah perpindahan ion pada gigi. Kondisi jenuh saliva memberikan kesempatan email teremineralisasi dan membantu melindungi gigi ketika terjadi proses kariogenik (Ritter, Boushell and Walter, 2019; Abdulla *et al.*, 2022).

1.2.3. Lesi subsurface/White spot Lesion (WSL)

Lesi white spot adalah demineralisasi karies aktif pada email gigi. Permukaan lesi white spot dikarakteristikan sebagai opasitas keruh berwarna putih yang halus pada permukaan gigi namun lebih lunak dibandingkan dengan email sekitarnya. Tampakkan keputihan pada lesi white spot terjadi karena fenomena optik setelah terjadinya kehilangan mineral pada email (Seevalingam *et al.*, 2024). Secara klinis, lesi white

spot memiliki permukaan yang halus bila dilakukan probing dengan eksplorasi namun terjadi demineralisasi di bawah permukaan (40-70%). Walaupun permukaan email halus namun kandungan mineralnya rendah dibandingkan email sehat sehingga lebih rentan dan mudah rusak ketika dilakukan probing serta nilai kekerasannya menjadi lebih rendah. Lesi white spot sering terjadi pada orang yang kurang memperhatikan oral hygiene atau yang sedang menjalani perawatan ortodontik (Lata, Varghese and Varughese, 2010; Ritter, Boushell and Walter, 2019; Abdulla *et al.*, 2022).

Studi longitudinal telah dilakukan dengan mengamati proses alami lesi white spot menemukan bahwa walaupun beberapa lesi white spot mengecil, kebanyakan tidak berubah bahkan setelah 2 tahun. Proses remineralisasi merupakan proses yang lama, tendensi kembalinya mineral dalam permukaan gigi pada lesi white spot terjadi karena gradien konsentrasi ion yang rendah dari saliva ke dalam lesi (Philip, 2019).



Gambar 3. Lesi *white spot* pada servikal gigi insisivus atas

Sumber: Welbury R, Duggal MS, Hosey M. Paediatric Dentistry. Fifth edit. Oxford: Oxford University Press; 2018. 97–99 hal)

1.2.4. Casein PhosphoPeptide-Amorphous Calcium Phosphat (CPP-ACP)

Pada tahun 1950an, produk susu dibuktikan efektif dalam mencegah karies tanpa efek samping pada gigi. Casein adalah fosfoprotein dominan pada susu sapi dan terutama menyumbang hampir 80% dari total proteinnya sebagai kompleks miseluler yang distabilkan oleh kalsium fosfat yang dapat dilepaskan sebagai peptida kecil (CPP) melalui pencernaan enzimatik parsial. Hal ini menyebabkan berkembangnya teknologi remineralisasi berdasarkan kompleks ACP yang distabilkan CPP (CPP-ACP) (RecaldentR CASRN691364-49-5) dan Kompleks ACFP yang distabilkan CPP (CPP-ACFP). CPP-ACP dapat dengan mudah dimurnikan dari pencernaan kasein triptik dengan presipitasi selektif, pertukaran zat besi, atau ultrafiltrasi. Kasein fosfopeptida (CPP), yang mengandung urutan gugus asam amino -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu dari kasein. Selain itu, CPP tidak memiliki keterbatasan yang terkait dengan penggunaan kasein seperti sifat organoleptik yang merugikan dan jumlah besar yang diperlukan untuk kemanjurannya. Potensi aktivitas antikariogeniknya spesifik setidaknya 10 kali lebih besar pada berat dasar untuk CPP dibandingkan untuk hanya kasein (Shyam *et al.*, 2017; Chhabra and Chhabra, 2018).

Konsep CPP-ACP sebagai agen remineralisasi pertama kali muncul pada tahun 1998. Kompleks CPP-ACP telah dipatenkan oleh Universitas Melbourne, Australia, dan Otoritas Industri Susu Victoria, Abbotsford, Australia. Bonlac Food Limited (perusahaan Australia yang dimiliki oleh 2.300 peternak sapi perah di Victoria dan Tasmania) tetap mempertahankan produksi eksklusif dan hak pemasaran untuk CPP-ACP dan merupakan pemilik merek dagang Recaldent™. Efek antikariogenik protektif kompleks CPP-ACP telah ditunjukkan di berbagai laboratorium, penelitian in situ pada hewan dan manusia. Salah satu kelebihan produk CCP-ACP terhadap fluoride adalah tidak menyebabkan fluorosis dan dapat dicerna tidak seperti fluoride yang mempunyai risiko bila ditelan dalam jumlah banyak (Chhabra and Chhabra, 2018).

CPP-ACP merupakan salah satu agen remineralisasi yang banyak digunakan saat ini. Bahan aktif CPP-ACP yaitu Recaldent™ (protein casein) 10% (Coceska *et al.*, 2016). CPP-ACP menggunakan protein casein yang ditemukan dalam susu untuk menstabilisasi ACP/ion kalsium fosfat dalam remineralisasi gigi dengan membentuk micelles. Sebuah penelitian oleh Cochrane dkk menunjukkan CPP-ACP dapat menstabilkan ion kalium, fosfat dan fluoride dalam konsentrasi tinggi dalam semua nilai pH (7,0-4,5) (Chhabra and Chhabra, 2018; Grohe and Mittler, 2021).

Banyak penelitian yang telah membuktikan CPP-ACP sebagai agen remineralisasi pada gigi. CPP-ACP melokalisasi ion kalsium dan fosfat dalam plak yang menyediakan reservoir ion kalsium fosfat mudah larut pada permukaan gigi yang akan pecah masuk ke dalam ruang kristal kosong ketika terjadi demineralisasi. Pada kondisi asam, CPP-ACP melekat pada biofilm kemudian melepaskan ion kalsium dan fosfat dan terbentuk lingkungan mineral jenuh, sehingga menghambat demineralisasi dan meningkatkan remineralisasi lesi insipien dengan presipitasi ion yang dilepaskan. Jumlah kehilangan kalsium dari plak selama penggunaan CPP-ACP menurun dan memungkinkan kembalinya konsentrasi kalsium awal. CPP-ACP juga mampu melakukan buffer pada keasaman plak dengan melepaskan asam amino secara langsung atau secara tidak langsung melalui katabolisme bakteri (Coceska *et al.*, 2016; Shyam *et al.*, 2017; Chhabra and Chhabra, 2018; Philip, 2019; Farooq and Bugshan, 2021).

CPP-ACP dapat remineralisasi lesi bawah permukaan email dengan kecepatan $1,5 \text{ hingga } 3,9 \times 10^{-8} \text{ mol HA m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. CCP dapat menstabilisasi 100 kali lipat kalsium fosfat daripada yang biasanya mungkin terjadi dalam larutan air pada pH netral dan basa sebelum pengendapan spontan. ACP, fase kristal dikalsium fosfat dehidrasi, dan oktakalsium fosfat telah diusulkan sebagai struktur perantara dalam pembentukan HA, tergantung pada pH dan derajat kejenuhan. Dengan asumsi mineral yang diendapkan pada lesi remineralisasi didominasi HA, maksimal laju remineralisasi rata-rata adalah $3,9 \pm 0,8 \times 10^{-8} \text{ mol HA/m}^2$ untuk periode sepuluh hari. Nilai ini setara dengan tingkat maksimal remineralisasi lesi bawah permukaan email diperoleh de Rooij dan Nancollas menggunakan prosedur komposisi konstan. Penelitian in vitro lainnya menunjukkan setelah periode sepuluh hari, larutan 1,0% CPP-kalsium fosfat (pH 7,0) dapat membantu 63,9%+20,1% remineralisasi email

pada lesi bawah permukaan jika dibandingkan dengan larutan CPP-ACP dengan konsentrasi lebih rendah (Chhabra and Chhabra, 2018).

Bentuk aplikasi CPP-ACP yang paling umum digunakan adalah sorbitol bebas gula atau permen karet berbasis xylitol. Sediaan lain termasuk susu, obat kumur, pelega tenggorokan, dan krim dental. CPP-ACP tidak seperti fluoride, dapat ditambahkan ke makanan yang mengandung gula dan karena itu memiliki potensi komersial sebagai tambahan makanan serta pasta gigi untuk mengontrol karies gigi (Shyam *et al.*, 2017).

1.2.5. Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Kerang hijau (*Perna viridis*) atau yang dikenal sebagai green mussel adalah binatang lunak (mollusca) yang hidup di laut, memiliki sepasang cangkang, dan berwarna hijau. Kerang hijau merupakan organisme kelas pelecypoda, di mana kelas pelecypoda selalu mempunyai cangkang katup sepasang sehingga disebut bivalvia. Kerang hijau mengandung daging sekitar 30% dari berat keseluruhan. Insangnya berlapis-lapis (Lamelii branchia) dan berkaki kapak (Pelecypoda) serta memiliki benang byssus. Kerang hijau adalah "*suspension feeder*", dapat berpindah-pindah tempat dengan menggunakan kaki dan benang "byssus", hidup dengan baik pada perairan dengan kisaran kedalaman 1 m sampai 7 m, memiliki toleransi terhadap perubahan salinitas antara 27-35 per mil (Aridhani, Kurnyawaty and Oko, 2021).

Nama ilmiah: *Perna viridis*

Famili: Mytilidae

Filum: Moluska

Kelas: Bivalvia

Kerajaan: Animalia

Ordo: Mytiloida

Spesies: *Perna viridis*



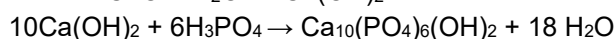
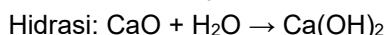
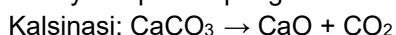
Gambar 4. Kerang hijau (*Perna viridis*)

Sumber : <https://darilaut.id/berita/penelitian-terbaru-sebagian-kerang-hijau-pantai-utara-jawa-tak-layak-konsumsi>

Cangkang kerang hijau memiliki kandungan kalsium yang tinggi dan memiliki kualitas baik dan komposisi kalsium karbonat yang murni sehingga berpotensi digunakan untuk bahan baku bio-material. Cangkang kerang hijau mengandung 95%-99% kalsium karbonat dengan bahan organik lain dan oksida seperti SiO₂, MgO

dan SO_3 . Hal ini mirip dengan komposisi tulang dengan kandungan Kalsium Karbon (CaC) yang tinggi dan tidak mengandung unsur logam berat seperti merkuri (Hg) atau arsen (As) di dalam produk cangkangnya, yang tentunya praktis untuk keperluan biomedis. Pengolahan bubuk dan teknik kalsinasi-disolusi-presipitasi (CDP) selanjutnya untuk mendaur ulang cangkang menjadi nilai tambah kalsium karbonat (Precipitated Calcium Carbonat/PCC) yang diendapkan. Dalam studi eksperimental, cangkang kerang hijau dicuci dan digiling dan diikuti dengan perlakuan panas pada suhu yang berbeda dalam tungku listrik. Proses kalsinasi akan memecah CaCO_3 menjadi CaO dan CO_2 . Setelah itu akan dicampurkan dengan air menghasilkan Ca(OH)_2 . Larutan Ca(OH)_2 kemudian dicampurkan dengan asam fosfat (H_3PO_4) untuk menghasilkan hidroksiapatit. (Syafaat and Yusuf, 2019; Ismail *et al.*, 2021; Revankar *et al.*, 2021).

Gambaran senyawa proses pengolahan hidroksiapatit dari cangkang kerang hijau



(Islamilennio and Irfai, 2016; Rachmantio and Irfai, 2023)

Kerang hijau (*Perna viridis*) merupakan salah satu sumber daya perikanan Indonesia yang paling banyak diperoleh dari penangkapan di alam. Kerang hijau sering dipanen sebagai sumber makanan dan ditemukan di perairan pantai, hutan bakau dan muara sungai. Normalnya waktu produktivitas kerang hijau paling tinggi pada Maret hingga Juli. Saat ini, produksi kerang hijau di Indonesia telah mencapai 309.886 ton per tahun (data tahun 2018). Jika kerang ini mempunyai 70% dari total berat kerang, maka 216.902 ton limbah kerang hijau memerlukan pembuangan yang tepat untuk mengurangi pencemaran lingkungan. Limbah cangkang kerang hijau dapat didaur ulang menjadi produk bernilai tambah. Upaya telah dilakukan dalam dekade terakhir untuk memproses cangkang ini menjadi kalsium karbonat. Kalsium karbonat ini dapat menjadi sumber kalsium untuk sintesis HA yang dapat digunakan sebagai agen remineralisasi (Sari and Yusuf, 2018; Ismail *et al.*, 2021).

Beberapa penelitian terdahulu yang dilakukan menggunakan cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) disajikan dalam tabel berikut ini:

Tabel 1. Tabel Sintesa Penelitian Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Nama Peneliti (Tahun)	Judul	Kesimpulan
1. R. Ismail, D.F. Fitriyana, Y.I. Santosa, S. Nugroho, A.J. Hakim, M.S. Al Mulqi, J. Jamari , A.P. Bayuseno (Ismail <i>et al.</i> , 2021)	The potential use of green mussel (<i>Perna Viridis</i>) shells for synthetic calcium carbonate polymorphs in biomaterials	Cangkang kerang hijau dapat menjadi bahan yang digunakan dalam dunia biomedis
2. Vanita Dattatraya Revankar, R Saranyan, Yadav Chakravarthy, E Manivannan, M RajMohan (Revankar <i>et al.</i> , 2021)	Remineralising Potential of Marine Skeletal Species- <i>Perna viridis</i> Powder Extract on Human Teeth Enamel: An In-vitro Study	Kerang hijau dengan konsentrasi kalsium 95% dapat remineralisasi lesi permukaan email
3. Kajal Chakraborty, Minju Joy, Selsa Jose Chakkalakal, 2018	Antioxidant and antiinflammatory secondary metabolites from the Asian green mussel <i>Perna viridis</i>	Senyawa yang berasal dari kerang hijau Asia, <i>Perna viridis</i> menunjukkan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang potensial dibandingkan dengan yang ditunjukkan oleh senyawa lain yang diteliti
4. Agung Shamsuddin Saragih, Amin Pamungkas and Alfian Noviyanto, 2020	Synthesis of Hydroxyapatite from Indonesian Green Mussels (<i>Perna viridis</i>) via Precipitation Methods	Hidroksiapatit dari limbah cangkang kerang hijau disintesis menggunakan metode pengendapan. Hasil uji XRF menunjukkan komposisi kulit kerang hijau memiliki kalsium dalam jumlah yang besar. Unsur kalsium, fosfat dan hidroksil sebagai penyusun hidroksiapatit telah diidentifikasi dan hidroksiapatit dari cangkang kerang hijau telah sesuai dengan standar acuan hidroksiapatit

Lanjutan Tabel 1

Nama Peneliti (Tahun)	Judul	Kesimpulan
5. Akbar Aulia Hidayat, Indra Bramanti, dan Iwa Sutardjo RS.,	Pengaruh gel ekstrak cangkang kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) terhadap kadar kalsium email gigi desidui (kajian in vitro menggunakan bahan demineralisasi asam fosforik 37%)	Terdapat perbedaan waktu retensi gel ekstrak cangkang kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) dan CPP-ACP terhadap kadar kalsium permukaan enamel gigi desidui dengan aplikasi 30 menit merupakan waktu optimal dan tidak ada perbedaan di antara keduanya.
6. Mitta Sheliana Kumala Dewi, Retno Ardhani, Indra Bramanti	Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Cangkang Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) terhadap Kekasaran dan Kekerasan Email Gigi Decidui setelah Demineralisasi	Kesimpulan penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak cangkang kerang hijau 1% lebih berpengaruh dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak cangkang kerang hijau 10% dan 18% dalam menurunkan kekasaran dan meningkatkan kekerasan permukaan email gigi desidui setelah demineralisasi.

1.3. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, perumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah ekstrak cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) mempengaruhi kekerasan mikro dan rasio kalsium fosfat pada remineralisasi gigi permanen muda?

1.4. Tujuan

1.4.1. Umum

Menganalisis pengaruh ekstrak cangkang kerang hijau terhadap kekerasan mikro dan rasio kalsium fosfat pada remineralisasi gigi permanen muda.

1.4.2. Khusus

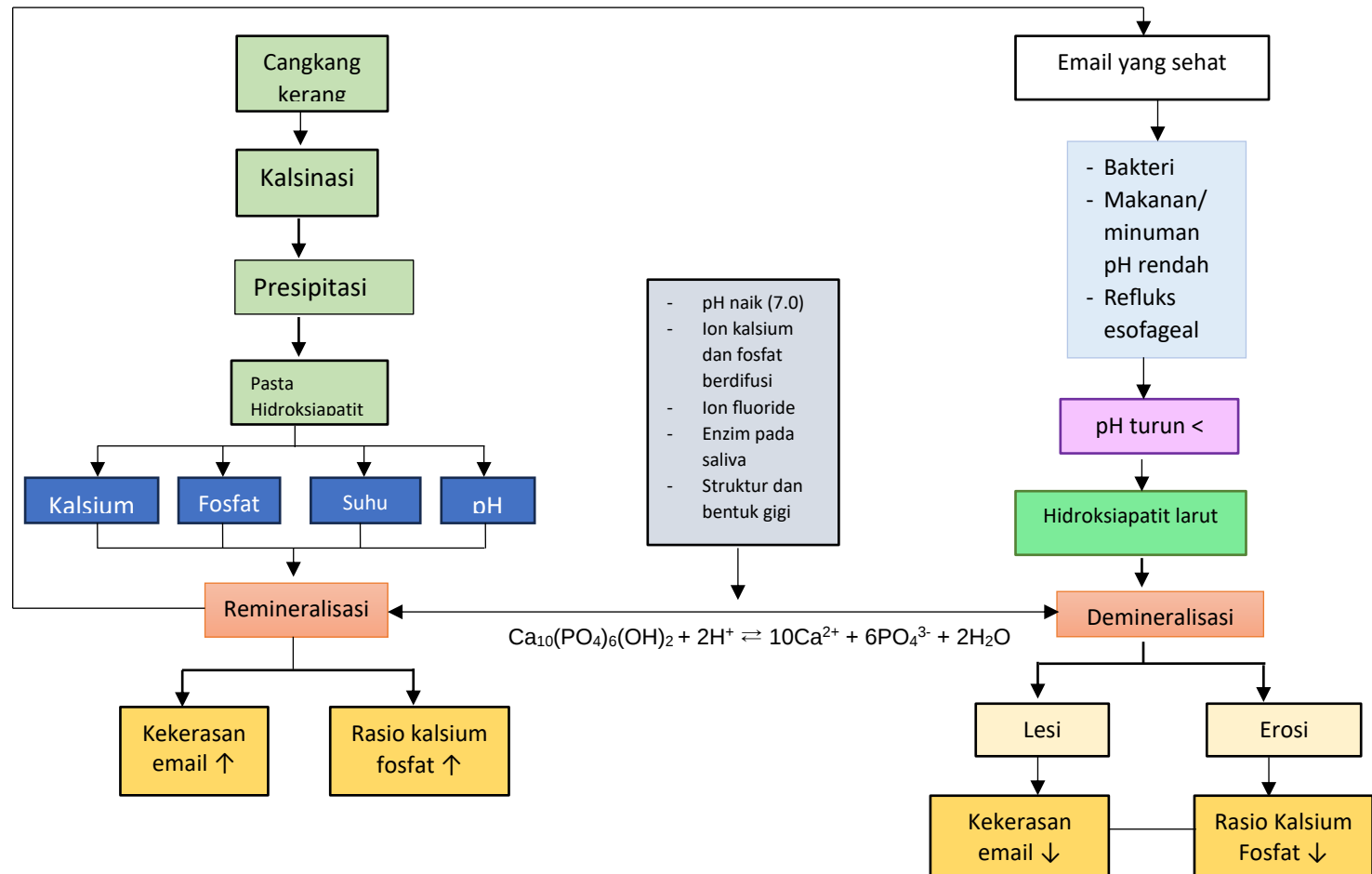
1. Menganalisis pengaruh ekstrak cangkang kerang hijau terhadap tingkat kekerasan mikro pada remineralisasi gigi permanen muda

2. Menganalisis pengaruh ekstrak cangkang kerang hijau terhadap rasio kalsium fosfat pada remineralisasi gigi permanen muda
3. Menganalisis pengaruh ekstrak cangkang kerang hijau berdasarkan jumlah konsentrasi 10%, 20% dan 30% terhadap remineralisasi gigi permanen muda

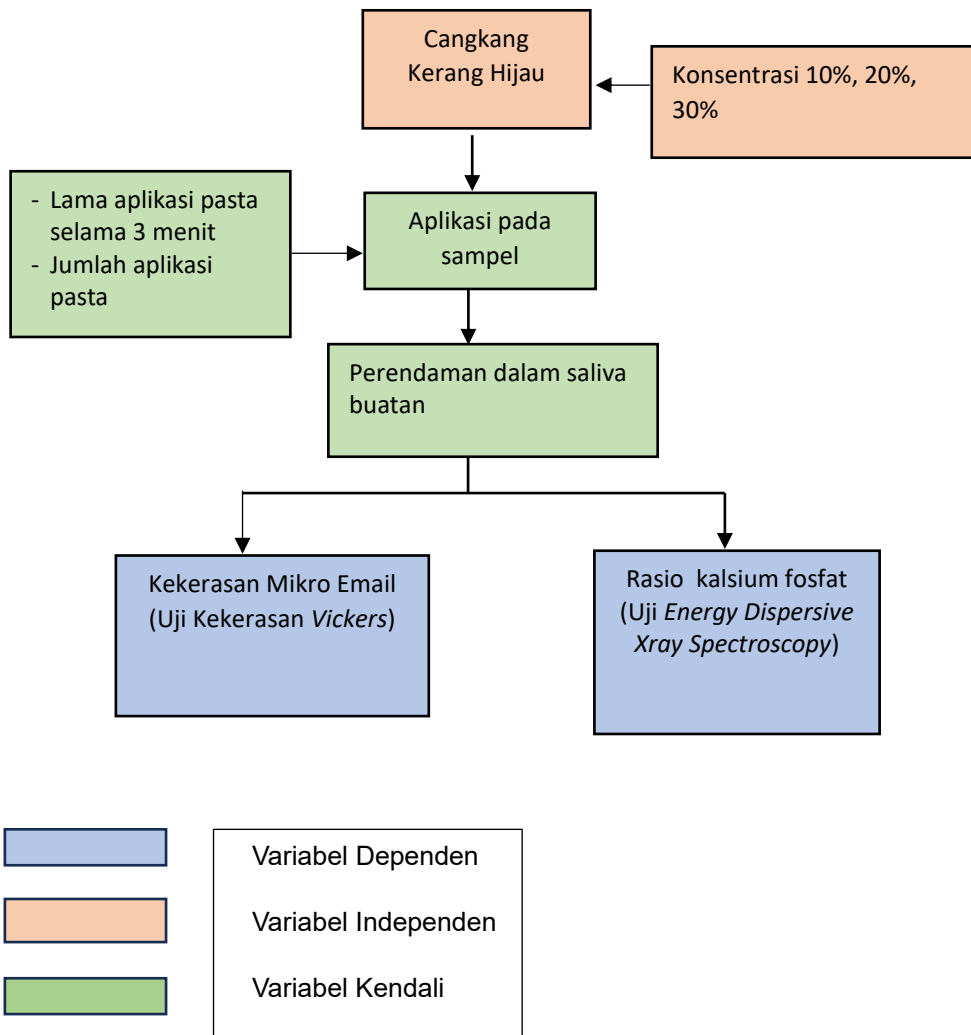
1.5. Manfaat

1. Menambah pengetahuan tentang manfaat limbah cangkang kerang hijau sebagai agen remineralisasi gigi
2. Sumber informasi yang dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan pemanfaatan cangkang kerang hijau dalam bidang kedokteran gigi.

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Konsep



1.8. Hipotesis

Ekstrak cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) memiliki pengaruh terhadap kekerasan mikro dan rasio kalsium fosfat pada remineralisasi gigi permanen muda.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *post test-only control group design*.

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

2.2.1. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan pasta hidroksiapatit di laboratorium Biokimia Kabupaten Pangkep
2. Pembuatan saliva buatan di laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
3. Proses demineralisasi dan remineralisasi di Balai Besar Laboratorium Makassar.
4. Pengujian sampel dengan uji Vickers di laboratorium Mekanik Politeknik Negeri Ujung Pandang
5. Pengujian sampel dengan uji EDS di laboratorium mikrostruktur Politeknik Negeri Ujung Pandang.
6. Pengujian *powder* hidroksiapatit dengan uji SEM di laboratorium mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia

2.2.2. Waktu Penelitian

Juli-November 2024

2.3 Sampel Penelitian

2.3.1. Jenis Sampel

Sampel menggunakan gigi premolar yang diekstraksi

2.3.2. Kriteria Sampel

1. Kriteria inklusi
 - Gigi premolar tanpa kavitas
 - Gigi premolar tanpa fraktur
 - Gigi premolar tanpa tumpatan
2. Kriteria eksklusi
 - Gigi premolar yang mengalami kelainan struktur gigi seperti hipomineralisasi.

2.3.3. Jumlah Sampel

Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Frederer:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

t= jumlah kelompok perlakuan

n= replikasi (besar sampel per kelompok)

Cara perhitungan besar sampel :

$$\begin{aligned} t=6 \text{ kelompok perlakuan} &\longrightarrow (6-1)(n-1) \geq 15 \\ &(5n-5) \geq 15 \\ &5n \geq 20 \\ &N \geq 4 \end{aligned}$$

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sampel untuk setiap kelompok perlakuan adalah 6 sampel. Jadi jumlah sampel minimal adalah $6 \times 4 = 24$ sampel.

Kelompok perlakuan dibagi atas:

1. Tanpa perlakuan (Kontrol negatif)
2. Demineralisasi
3. Demineralisasi diikuti aplikasi CPP-ACP (Kontrol positif)
4. Demineralisasi diikuti aplikasi pasta ekstrak cangkang kerang hijau 10%
5. Demineralisasi diikuti aplikasi pasta ekstrak cangkang kerang hijau 20%
6. Demineralisasi diikuti aplikasi pasta ekstrak cangkang kerang hijau 30%

2.4 Alat dan Bahan Penelitian

2.4.1. Alat Penelitian

Pasta *Hidroxyapatit* Cangkang kerang hijau (*Perna viridis*)

1. Wadah untuk mencuci cangkang kerang
2. Ball milling untuk mengecilkan ukuran cangkang kerang
3. Saringan *mesh*
4. Tungku *Carbolite*
5. *Magnetic stirrer*
6. Tabung *autoclave*
7. Kertas saring *Whatman 42*
8. Neraca Analitik digital
9. Gelas Piala
10. *Barnstead/Thermolyne Small Benchtop Muffle Furnaces, Type 1400, Thermo Fisher Scientific*

Persiapan sampel

1. Scaler
2. *Carborundum disc bur*
3. Nail varnish
4. *Powder* dan liquid akrilik
5. Cetakan akrilik

6. Mikromotor
7. Pinset
8. Masker
9. Handscoen
10. Sonde halfmoon
11. Three way syringe
12. Cetakan/*mould*
13. Semen spatel

Perlakuan terhadap sampel:

1. Botol kaca
2. Inkubator (alat telah dikalibrasi)
3. Microbrush

Alat untuk menguji sampel telah dikalibrasi.

1. Vickers Microhardness Test
2. SEM-EDS

2.4.2. Bahan Penelitian

1. Gigi Premolar yang sudah diekstraksi
2. Pasta hidroksiapatit dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%
3. Saliva buatan
4. Aquades
5. CPP-ACP (Tooth mousse, GC)
6. Larutan saline
7. Vaseline
8. Deionized water
9. Self curing acrylic (*powder* dan liquid)
10. Asam fosfat (etsa) 37%

2.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

2.5.1. Variabel Penelitian

1. Variabel Dependen
Tingkat kekerasan mikro dan rasio kalsium fosfat
2. Variabel Independen
Ekstrak cangkang kerang hijau 10%, 20% dan 30%
3. Variabel antara
Proses demineralisasi dan remineralisasi
4. Variabel Kendali
Gigi premolar tanpa kavitas, tanpa fraktur, tanpa tumpatan
Perendaman sampel dalam saliva buatan.
Jumlah dan lama aplikasi pasta

2.5.2. Definisi Operasional

1. Pasta cangkang kerang hijau adalah hidroksiapatit hasil sintesis cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) dalam bentuk pasta yang diaplikasikan pada permukaan sampel gigi sebanyak 1 ml selama 3 menit.
2. CPP-ACP adalah sediaan bentuk pasta (Toothmousse, GC) sebagai bahan remineralisasi pabrikan yang diaplikasikan pada permukaan gigi sebanyak 1 ml selama 3 menit
3. Kekerasan mikro email adalah tingkat kekerasan email yang diukur dengan menggunakan uji *Vickers Microhardness* selama 10 detik dengan beban 100 gm. Nilai satuan menggunakan VHN (*Vickers Microhardness Number*)
4. Rasio kalsium fosfat adalah perbandingan antara jumlah persentase berat kalsium dan fosfat yang ada pada permukaan gigi dengan rumus Ca/P . Rasio hidroksiapatit murni yaitu 1,67.
5. Remineralisasi adalah kembalinya matriks anorganik yang telah larut ke dalam email yang diukur dengan melihat kekerasan mikro dan rasio kalsium dan fosfat dalam gigi.

2.6 Prosedur Penelitian

2.6.1. Pembuatan Pasta Ekstrak Cangkang kerang hijau

Limbah cangkang kerang hijau yang diperoleh dari perairan Labakkang, Kabupaten Pangkajene Kepulauan (Pangkep) dibersihkan dari daging dan alga kemudian dijemur. Pengecilan ukuran kerang hijau dilakukan dengan cara ball milling dan disaring dengan mesh 100. Proses ini menghasilkan serbuk kulit kerang hijau yang kemudian dikalsinasi pada suhu 1000 °C selama 5 jam menggunakan tungku Muffle Furnance tipe 6000. Serbuk cangkang kerang hijau sebelum dan sesudah kalsinasi dikarakterisasi.

Bubuk cangkang kerang hijau yang telah dikalsinasi dicampur dengan 100ml aquades pada temperatur 40°C ditambahkan setetes demi setetes larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,3 M sebanyak 100 ml. Diaduk dengan magnetic stirrer pada suhu 70°C selama 60 menit. Endapan yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring Whatman 42 dan dikeringkan menggunakan oven selama 5 jam pada temperatur 110°C. Hasilnya ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Selanjutnya proses pembakaran Hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sampel hasil presipitasi dilakukan pembakaran dengan suhu 700°C, dengan menggunakan Muffle Furnance tipe 6000 selama 1 jam. Hasil pembakaran selanjutnya ditimbang dengan timbangan analitik.

Selanjutnya pembuatan pasta, pertama-tama bahan pengikat (CMC Na) ditimbang sebanyak 0,2 gram, dikembangkan dengan aquades di dalam cawan lalu dimasukkan dalam mortir. *Powder* cangkang kerang hijau sebanyak 10 gram, 20 gram dan 30 gram ditimbang, ditambahkan sedikit-sedikit kedalam pengikat

kemudian diaduk sampai homogen. Setelah pembuatan pasta cangkang kerang hijau dilakukan pemeriksaan komposisi unsur yang ada di dalamnya.

2.6.2. Persiapan sampel gigi

Sebanyak 24 gigi premolar yang memenuhi kriteria inklusi dibersihkan dari jaringan lunak dan kalkulus dengan scaler ultrasonic dan dibilas di bawah air mengalir. Bagian mahkota dari gigi dibersihkan dengan sikat dan pasta gigi. Gigi premolar dilakukan pemotongan pada bagian cementoenamel junction (CEJ) dengan bur diamond disc kemudian dibilas dengan aquades untuk menghilangkan serbuk gigi agar larut dalam air. Jaringan pulpa yang masih ada dibuang dengan jarum ekstirpasi. Pada bagian sepertiga tengah bukal gigi premolar dibuat jendela berukuran 4x4 mm dengan melapisi bagian gigi lainnya dengan nail varnish untuk membatasi area yang akan diberikan perlakuan. Sampel kemudian disimpan dalam larutan saline sebelum diberi perlakuan (Sahiti *et al.*, 2020; Abdulla *et al.*, 2022).

Prosedur penanaman gigi dalam akrilik

1. Campuran *self curing acrylic (powder dan liquid)* dituangkan ke dalam cetakan yang sudah dioles vaseline
2. Mahkota gigi premolar diletakkan di tengah cetakan
3. Dibiarkan hingga *setting* selama 30 menit
4. Setelah mengeras, hasil cetakan dikeluarkan dari cetakan
5. Nail varnish digunakan untuk menutupi batas pinggiran akrilik dan permukaan gigi
6. Bersihkan bagian bukal gigi yang akan diberi perlakuan

2.6.3. Prosedur demineralisasi gigi

Demineralisasi dilakukan menggunakan asam fosfat 37%. Asam fosfat diaplikasikan dengan menggunakan microbrush selama 30 detik kemudian sampel dibilas dengan air deionisasi selama 30 detik dan dikeringkan dengan air syringe selama 5 detik dan dimasukkan kembali ke dalam botol kaca sebelum perlakuan selanjutnya.

2.6.4. Prosedur Remineralisasi

Pasta ekstrak cangkang kerang hijau dan CPP-ACP diaplikasikan pada sampel gigi selama 3 menit setiap hari selama 14 hari. Sebelum dilakukan aplikasi, gigi terlebih dahulu dibilas dengan air deionised kemudian dikeringkan. Setelah dilakukan aplikasi, sampel kemudian dimasukkan ke dalam saliva buatan dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C. Saliva buatan diganti setiap hari. (Sahiti *et al.*, 2020)

2.6.5. Uji Kekerasan Mikro

1. Persiapkan kelompok sampel gigi yang akan dilakukan uji kekerasan mikro.
2. Sampel diletakkan pada meja alat Vickers microhardness tester dan diatur sedemikian rupa agar tepat di tengah lensa objektif dan difokuskan dengan cara memutar pegangan yang ada pada sebelah kanan alat searah jarum jam
3. Setelah terlihat fokus pada lensa, sampel digeser hingga tepat berada di bawah *diamond penetrator*
4. *Diamond penetrator* akan turun ditandai dengan menyalnya lampu hijau. Apabila *diamond penetrator* telah menyentuh sampel, maka lampu merah akan naik lalu ditunggu hingga lampu padam
5. Uji kekerasan dilakukan dengan indensitas 100 gm dengan waktu 10 detik. Uji kekerasan dilakukan sebanyak 3 kali kemudian dilakukan pengukuran rata-rata.

2.6.6. Uji Rasio Kalsium dan Fosfat pada gigi

Sampel dikeringkan dan ditempatkan pada lempengan aluminium. Dilakukan coating dengan menggunakan Au atau cairan emas. Setelah dilakukan coating, sampel dimasukkan ke dalam mesin SEM-EDS lalu dilakukan karakterisasi kimia dengan menggunakan mesin EDS. Dilakukan penghitungan kandungan kalsium dan fosfat dengan menggunakan *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (EDS) dalam satuan persentase berat (wt%) kemudian dikonversi menjadi rasio Ca/P pada setiap kelompok (Poorni *et al.*, 2010).

2.7 Analisis Data

1. Jenis Data : Data Primer
2. Pengolahan data : SPSS 27.0 untuk Windows
3. Analisis Data : Uji normalitas dengan Shapiro Wilk $p > 0,05$. Jika memenuhi syarat maka dilakukan Uji oneway ANOVA dan post hoc LSD. Hasil uji dinyatakan signifikan jika nilai $p < 0,05$.
4. Penyajian data : Dalam bentuk gambar, tabel dan grafik

2.8 Alur Penelitian

