

Jurnal Kesehatan Gigi

Applications of Whey Extract and Cpp-Acp in Email Surface Towards Enamel Surface Hardness After Extracoronary Bleaching

Irfan Dwiandhono¹, Dian Noviyanti Agus Imam², Afiatul Mukaromah³

¹Bagian Konservasi Gigi, Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

²Bagian Dental Material, Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

³Jurusan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Indonesia

Corresponding author: Irfan Dwiandhono

Email: irfandrg@gmail.com

Received: October 10th, 2019; Revised: November 25th, 2019; Accepted: December 30th, 2019

ABSTRACT

Teeth have an aesthetic value because teeth which are clean, neat and white can increase self confidence. Staining or dental discoloration can disrupt the appearance and cause discomfort. The most common type of discoloration is extrinsic discoloration. Treatment that can be done to overcome extrinsic discoloration is extracoronary bleaching. One way to avoid the extracoronary bleaching side effects is application of remineralization materials. The recommended remineralization materials for post-bleaching are fluoride and phospho peptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP). This research aims to know the effect of whey extract application and CPP-ACP on tooth enamel hardness after extracoronary bleaching. Experimental laboratory with pre- and post-test control design was performed on 24 first maxillary premolar which divided into 3 groups. On group I, specimens were immersed in artificial saliva. Specimen in group II were immersed in whey extract meanwhile specimens were immersed in CPP-ACP on group III. Whey extract and CPP-ACP immersions were conducted 10 minutes every 12 hours for 15 days. The enamel surface roughness test was performed twice, after extracoronary bleaching treatment and after 15 days remineralization agent application. This study result indicated significant differences between group I and group II and group III ($p < 0,05$), but there was no significant difference between group II and group III ($p > 0,05$). This study showed the enamel surface hardness after whey extract application is higher than CPP-ACP but difference was not significant statistically

Keyword: whey extract; CPP-ACP, enamel surface hardness; extracoronary bleaching

Pendahuluan

Gigi memiliki nilai estetika karena gigi yang bersih, rapih dan putih dapat menambah kepercayaan diri seseorang. Pewarnaan atau diskolorasi gigi dapat mengganggu penampilan dan menimbulkan rasa tidak percaya diri. Diskolorasi gigi dibedakan menjadi dua jenis yaitu diskolorasi ekstrinsik dan intrinsik. Jenis diskolorasi yang paling sering terjadi adalah

diskolorasi ekstrinsik. Diskolorasi ekstrinsik merupakan pewarnaan yang terjadi pada permukaan email dan bersifat lokal. Diskolorasi ekstrinsik disebabkan oleh zat yang terkandung dalam makanan atau minuman berwarna, rokok, plak, perdarahan gingiva, dan lain-lain¹.

Diskolorasi ekstrinsik menimbulkan masalah estetik dalam bidang kedokteran gigi sehingga mendorong pasien mengupayakan perbaikan. Perawatan yang dapat dilakukan untuk mengatasi

diskolorasi ekstrinsik antara lain *bleaching* ekstrakoronal. *Bleaching* ekstrakoronal dilakukan dengan prinsip reaksi oksidasi dari bahan *bleaching* terhadap struktur gigi. Salah satu bahan *bleaching* yang sering digunakan adalah hidrogen peroksida (H₂O₂)². Efek samping aplikasi bahan *bleaching* pada prosedur *bleaching* ekstrakoronal antara lain menyebabkan gigi sensitif dan perubahan struktur mikro email³. Penelitian menunjukkan perubahan struktur mikro yang terjadi pasca *bleaching* ekstrakoronal antara lain demineralisasi, degradasi, peningkatan porositas email, peningkatan kekasaran permukaan email dan penurunan kekerasan mikro⁴.

Salah satu cara menghindari efek samping *bleaching* ekstrakoronal adalah aplikasi bahan remineralisasi. Proses remineralisasi merupakan prosedur terapi menggunakan bahan remineralisasi untuk mengembalikan mineral gigi yang hilang. Bahan remineralisasi yang dianjurkan untuk digunakan pasca *bleaching* yaitu fluor dan *casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate* (CPP-ACP)³.

CPP-ACP adalah derivat protein susu yang menjadi sumber ion kalsium dan fosfat. Ion kalsium dan fosfat tersebut dapat menggantikan struktur kalsium hidroksiapatit yang rusak, sehingga terjadi proses remineralisasi gigi^{3,4}. Kelebihan CPP-ACP antara lain tidak menimbulkan fluorosis dan mampu menghantarkan ion kalsium dan fosfat ke permukaan email tanpa mengalami kristalisasi terlebih dahulu. CPP-ACP memiliki sifat kurang menguntungkan antara lain kelarutan CPP-ACP dalam pH asam, afinitas dan daya penetrasi rendah terhadap permukaan email yang mengalami erosi. Sifat tersebut menyebabkan kemampuan kalsium dan fosfat untuk melekat pada permukaan gigi yang mengalami demineralisasi menurun, sehingga proses remineralisasi terganggu⁵.

Bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif bahan remineralisasi yaitu *whey extract*. *Whey extract* adalah derivat yogurt atau susu yang difermentasikan. Cara memisahkan *whey* dapat dilakukan menggunakan sentrifugator, sehingga didapatkan dua bagian yang terpisah. Bagian yang berat dan mengendap dari hasil proses sentrifugasi merupakan *whey extract*⁶. Yogurt dan derivatnya menjadi sumber kalsium dan fosfat yang membantu meningkatkan proses remineralisasi. Kandungan kalsium dan fosfat dalam yogurt dan derivatnya lebih tinggi dibandingkan susu karena adanya aktivitas bakteri proteolitik. Yogurt dan

derivatnya memiliki pH asam yang menyebabkan kandungan kalsium dan fosfat berbentuk mineral terionisasi. Kalsium dan fosfat yang berbentuk ion memiliki kemampuan perlekatan pada permukaan email yang lebih baik dibandingkan kalsium dan fosfat dalam susu⁷. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan uji pengaruh aplikasi *whey extract* pada permukaan email terhadap kekerasan permukaan email pasca *bleaching* ekstrakoronal. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh aplikasi *whey extract* dan *casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate* (CPP-ACP) terhadap kekerasan permukaan email gigi pasca *bleaching* ekstrakoronal.

Metode Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi Surakarta Nomor : 197/III/HREC/2017. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *whey extract* dan CPP-ACP (GC Toothmouse, GC Japan). *Whey extract* dibuat dari yogurt tawar yang tidak diberi perasa dan memiliki konsistensi kental (YOBO, Yobo Nutrition, Banyumas, Indonesia). Yogurt disaring menggunakan kain putih untuk memisahkan *whey* dengan daduhnya. Cairan *whey* yang telah didapatkan disaring lagi menggunakan kertas saring untuk menghilangkan partikel-partikel yang masih tersisa dalam cairan *whey*. *Whey extract* yang dihasilkan kemudian ditempatkan dalam botol yang tertutup rapat dan disimpan dalam lemari es hingga *whey extract* digunakan⁶.

Dua puluh empat gigi premolar rahang atas dipotong secara horizontal kurang lebih 1mm di bawah CEJ menggunakan diamond disc bur dengan air dingin. Mahkota gigi yang telah dipotong kemudian ditanam di resin akrilik *self cure* dengan permukaan bukal gigi bebas dari resin akrilik. Cetakan yang digunakan untuk menanam sampel terbuat dari kuningan dengan diameter 22mm dan tinggi 10mm^{8,9}. Semua sampel dalam tiap kelompok diaplikasikan bahan *bleaching* hidrogen peroksida 40% pada seluruh permukaan email gigi menggunakan spuit dan diratakan dengan menggunakan tip. Sampel dibersihkan dari bahan *bleaching* menggunakan kapas setelah 8 menit. Aplikasi bahan *bleaching* dilakukan sebanyak 3 kali, sehingga total waktu aplikasi yaitu 24 menit. Sampel penelitian dibilas menggunakan akuades setelah aplikasi bahan *bleaching* yang terakhir dan dihitung kekerasan permukaan email

sampel segera setelah prosedur pemutihan gigi (*pre-test*)⁴. Sampel gigi selanjutnya dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok I (kontrol), kelompok II dan kelompok III. Tiap-tiap kelompok terdiri dari 8 buah sampel.

Sampel pada kelompok I (kontrol) direndam dalam saliva buatan setelah aplikasi bahan bleaching selama 15 hari dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C. Saliva buatan diganti setiap 12 jam. Sampel pada kelompok II direndam dalam whey extract selama 10 menit setiap 12 jam. Sampel pada kelompok III direndam CPP-ACP selama 10 menit setiap 12 jam. Sampel yang direndam whey extract atau CPP-ACP kemudian direndam saliva buatan dan disimpan di dalam inkubator pada suhu 37°C. Prosedur pada kelompok II dan III diulang selama 15 hari. Uji kekerasan permukaan dilakukan setelah sampel mendapat perlakuan pada hari ke-15 (Post-test). Aplikasi bahan remineralisasi dilakukan selama 15 hari karena waktu rata-rata yang diperlukan CPP-ACP untuk mendapatkan efek remineralisasi pada gigi setelah paparan zat asam paling sedikit 14 hari sebelumnya⁴.

Uji kekerasan permukaan dilakukan menggunakan *Vickers microhardness test* pada sampel gigi yang telah ditanam di dalam resin dan diberi tekanan dengan beban 25 gram selama 25 detik pada 1 titik di sepertiga permukaan bukal gigi. Nilai kekerasan pada 1 titik tekan dihitung dengan persamaan Vickers sebagai berikut :

$$Hv = 1,8544 \times \frac{P}{d^2}$$

Keterangan:

Hv = kekerasan Vickers(kg/mm²)

P = beban indenter (kg)

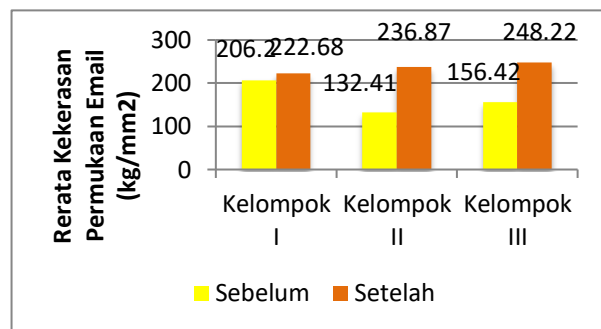
d = diameter jejak indenter (mm)

Hasil data yang didapatkan kemudian dilakukan analisis. Analisis pertama dilakukan uji normalitas menggunakan metode *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan metode *Levene-test*. Kemudian dilakukan uji statistik parametrik berupa *Paired T-test* dan *One way Anova*. Uji statistik *Paired T-test* digunakan untuk menganalisis nilai kekerasan permukaan email gigi segera setelah *bleaching* ekstrakoronal dan pasca aplikasi bahan remineralisasi gigi hari ke-15 masing-masing kelompok sampel. Uji statistik *One Way Anova* digunakan untuk menganalisis rerata nilai kekerasan permukaan email gigi antar kelompok sampel, selanjutnya dilakukan uji *least significance difference (LSD)* dengan tingkat kepercayaan 95%

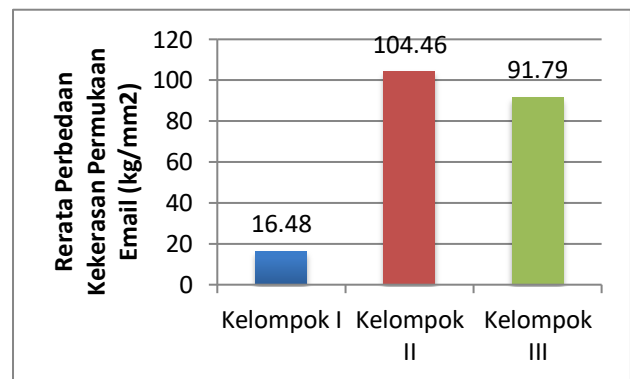
atau $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar kelompok sampel.

Hasil dan Pembahasan

Rerata kekerasan permukaan email sebelum dan setelah aplikasi saliva buatan pada kelompok I, *whey extract* pada kelompok II, dan CPP-ACP pada kelompok III dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya perbedaan kekerasan permukaan email sebelum dan setelah perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1 Grafik rerata kekerasan permukaan email sebelum dan setelah aplikasi whey extract dan CPP-ACP



Gambar 2. Grafik rerata perbedaan kekerasan permukaan email

Uji Saphiro-Wilk menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan Uji Levene menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$). Data selanjutnya dilakukan *Paired T-test* untuk membandingkan kekerasan permukaan email sebelum dan setelah perlakuan pada masing-masing kelompok sampel (Tabel 1). Analisis *Paired T-test* menunjukkan bahwa kelompok I tidak terjadi peningkatan kekerasan permukaan email yang bermakna antara sebelum dan setelah perendaman saliva buatan ($p > 0,05$). Peningkatan kekerasan permukaan email yang bermakna terjadi pada kelompok II dan III ($p < 0,05$).

Tabel 1.
Hasil Paired T-test Rerata Kekerasan Permukaan Email Sebelum dan Setelah Aplikasi Whey Extract dan CPP-ACP

| No | Kelompok | Rerata (kg/mm ²) ± SB | | Sig |
|----|----------|-----------------------------------|------------------|----------------|
| | | Sebelum | Setelah | |
| 1. | I | 206,20± 23,34 | 222,68± 4,03 | 0,05 1 |
| | II | 132,41± 56,23 | 236,87± 15,91 | 0,00 3 * |
| 3. | III | 156,42± 54,15 | 248,22± 58,33 | 0,00 1 * |

Keterangan: *= perbedaan bermakna yaitu p<0,005

Hasil uji One Way Anova menunjukkan terdapat perbedaan kekerasan permukaan email yang bermakna pada kelompok I, kelompok II, dan kelompok III (p<0,05). Rangkuman hasil analisis uji *Least Significance Difference* (LSD) dapat dilihat pada Tabel 2. Uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok III (p<0,05), tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok II dan kelompok III (p>0,05)

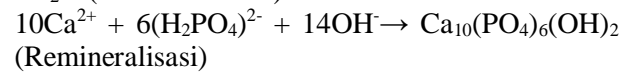
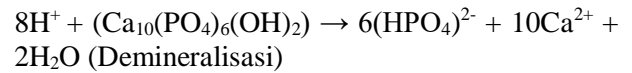
Tabel 2.
Hasil Uji Post Hoc Kekerasan Permukaan Email Menggunakan Metode Least Significance Difference (LSD)

| No. | Kelompok | I | II | III |
|-----|----------|--------|--------|--------|
| 1. | I | | 0,004* | 0,006* |
| 2. | II | 0,004* | | 0,867 |
| 3. | III | 0,006* | 0,867 | |

Keterangan: *= perbedaan bermakna yaitu p<0,05

Peningkatan kekerasan permukaan email pada kelompok I, II, dan III menunjukkan bahwa terjadi proses remineralisasi pada gigi. Saliva buatan, whey extract dan CPP-ACP mengandung mineral kalsium dan fosfat. Kalsium dan fosfat merupakan mineral utama dari Kristal hidroksiapatit. Kedua mineral tersebut mengakibatkan proses remineralisasi yang menghasilkan kristal hidroksiapatit. Kristal hidroksiapatit menurunkan celah internomatic dan mikroporositas email sehingga meningkatkan kekerasan permukaan email⁴.

Kerusakan kristal hidroksiapatit adalah tanda demineralisasi yang dimulai dengan adanya ikatan antara ion fosfat (PO₄³⁻) dari Kristal hidroksiapatit dengan ion H⁺ yang mengakibatkan larutnya kristal apatit. Ion H⁺ mengubah ion OH⁻ menjadi H₂O dan mengubah ion PO₄³⁻ menjadi ion HPO₄²⁻. Ketika kontak dengan asam, ion HPO₄²⁻ akan berubah menjadi H₂PO₄. Berikut reaksi kimia yang terjadi dalam proses demineralisasi dan remineralisasi⁴.



Whey extract mengandung ion kalsium dan fosfat serta memiliki kemampuan *buffer* yang berperan penting dalam proses remineralisasi gigi. Proses remineralisasi diawali dengan perlekatan protein *whey* pada permukaan email yang mengalami demineralisasi. Ion kalsium dan fosfat melekat pada plak gigi, sehingga menimbulkan keadaan supersaturasi mineral kalsium dan fosfat. Ion kalsium dan fosfat mengalami reaksi kimia, sehingga membentuk kristal hidroksiapatit. Hidroksiapatit yang terbentuk mengisi celah interprismatic email^{6,7},

CPP-ACP mampu melakukan proses remineralisasi pada permukaan email yang telah mengalami demineralisasi dengan baik. Amorf kalsium fosfat dalam CPP-ACP mengalami deposisi di permukaan dan dalam celah interprismatic email. *Calcium phosphopeptide* mengikat kalsium dan fosfat dalam bentuk nanopartikel, membentuk mineral yang stabil dan meningkatkan densitas kristal hidroksiapatit dan densitas prisma email. Peningkatan densitas prisma email dapat meningkatkan kekerasan permukaan email. Jika terdapat suatu agen demineralisasi dalam rongga mulut, maka kompleks CPP-ACP akan meningkatkan pelepasan kalsium dan fosfat yang menyebabkan kondisi supersaturasi mineral. Keadaan supersaturasi mineral tersebut dapat menghentikan proses demineralisasi dan meningkatkan proses remineralisasi^{7,10,11}.

Peningkatan kekerasan permukaan email yang paling rendah dan tidak bermakna yaitu kelompok I. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan peningkatan kekerasan permukaan email kelompok I tidak bermakna antara lain sampel kelompok ini hanya direndam dalam saliva buatan dan tidak diberi aplikasi bahan remineralisasi, kandungan kalsium dan fosfat dalam saliva buatan yang tidak homogen serta

proses perendaman sampel dalam saliva buatan yang tidak mengalir. Sumber kalsium dan fosfat kelompok I hanya berasal dari saliva buatan, namun mineral tersebut tidak tercampur secara homogen serta mengendap dalam cawan petri.

Perbedaan nilai peningkatan kekerasan permukaan email masing-masing kelompok terjadi akibat perbedaan efektivitas bahan remineralisasi yang digunakan. Efektivitas bahan remineralisasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain konsentrasi dan kelarutan bahan remineralisasi, derajat keasaman (pH), suhu, reaksi pembentukan kompleks, posisi titik keseimbangan dan formulasi kimia bahan remineralisasi^{5,12}.

Kelompok II mengalami peningkatan kekerasan permukaan email lebih tinggi dibandingkan kelompok III. Salah satu faktor yang dapat menyebabkan kelompok II mengalami peningkatan kekerasan permukaan email tertinggi antara lain pH *whey extract* yaitu sekitar 5,0-6,0. Derajat keasaman *whey extract* yang rendah dapat menyebabkan kalsium dan fosfat berbentuk mineral terionisasi yang reaktif, sehingga meningkatkan daya remineralisasi *whey extract*⁷. Peningkatan proses remineralisasi dapat terjadi pada bahan remineralisasi yang memiliki pH 4,5-5,1. Bahan remineralisasi yang memiliki pH asam mampu meningkatkan penyerapan dan reaksi pengikatan mineral serta menurunkan kelarutan mineral¹².

CPP-ACP memiliki mekanisme dan potensi remineralisasi yang berbeda pada kondisi lesi karies dan erosi. Perbedaan mekanisme dan remineralisasi terjadi karena perbedaan karakteristik struktur lesi karies dan erosi. Lesi erosi memiliki struktur pori yang lebih kecil dan mengandung lebih sedikit bahan organik daripada lesi karies. Hal ini menyebabkan adhesi CPP-ACP yang rendah ke permukaan gigi yang mengalami erosi. Adhesi CPP-ACP yang rendah pada lesi erosi mengakibatkan penetrasi kalsium dan fosfat ke dalam celah intermaksilaris menurun sehingga proses remineralisasi terganggu dan pembentukan kristal hidroksiapatit kurang maksimal^{5,13}.

Proses remineralisasi gigi pada kondisi lesi erosi berkaitan dengan deposisi dan reaksi mineral ke dalam celah interprismatik email. Mineral pada bahan remineralisasi bereaksi langsung ke permukaan gigi yang tererosi. *Whey extract* dapat melakukan mekanisme remineralisasi karena mengandung ion kalsium dan fosfat reaktif. Ion kalsium dan fosfat akan bereaksi langsung ke celah interprismatik enamel untuk menggantikan mineral yang hilang karena prosedur *bleaching* ekstrakoronal. Reaksi tersebut meningkatkan

proses penutupan celah email dan mengurangi porositas email sehingga menghasilkan peningkatan kekerasan permukaan email. Mekanisme tersebut merupakan salah satu penyebab *whey extract* dapat meningkatkan kekerasan permukaan email lebih tinggi daripada CPP-ACP^{7,12,13}.

Analisis statistik One Way ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kekerasan permukaan email yang bermakna antara kelompok I, kelompok II, dan kelompok III. Berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan kekerasan permukaan email yang bermakna antara kelompok I dengan kelompok II dan kelompok III tetapi tidak terdapat perbedaan kekerasan permukaan email yang bermakna antara kelompok II dengan kelompok III.

Whey extract dan CPP-ACP memiliki potensi yang sama sebagai bahan remineralisasi gigi pasca prosedur *bleaching* ekstrakoronal. Proses remineralisasi yang terjadi setelah aplikasi *whey extract* dan CPP-ACP akan menghasilkan hidroksiapatit. Hidroksiapatit yang terbentuk menempati celah interprismatik email dan penurunan porositas email. Porositas email yang menurun akan menyebabkan kekerasan permukaan email meningkat^{4,14}. Hasil penelitian yang telah dilakukan mendukung hasil penelitian sebelumnya yaitu *whey extract* memiliki tingkat remineralisasi yang lebih tinggi dibandingkan CPP-ACP namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna diantara keduanya. *Whey extract* memiliki potensi remineralisasi yang sama besar dengan CPP-ACP, sehingga *whey extract* dapat digunakan sebagai bahan remineralisasi pasca *bleaching* ekstrakoronal menggantikan CPP-ACP⁶.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *whey extract* dan *Calcium phosphopeptide-amorphous calcium phosphate* (CPP-ACP) dapat meningkatkan kekerasan permukaan email gigi pasca prosedur *bleaching* ekstrakoronal. Kekerasan permukaan email setelah aplikasi *whey extract* lebih tinggi dibandingkan CPP-ACP, namun analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara aplikasi *whey extract* dan CPP-ACP pasca *bleaching* ekstrakoronal

Daftar Pustaka

- [1] Garg N, Garg A. Textbook of Endodontics. 2nd ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher; 2010. p. 443
- [2] Hargreaves KM, Berman LH. Cohen's Pathways Of The Pulp. 11th ed. Missouri: Elsevier; 2016. pp. e96-e109
- [3] Yesilyurt C, Sezer U, Ayar MK, Alp CK, Tasdemir T. The effect of a new calcium-based agent, Pro-Argin, on the microhardness of bleached enamel surface. *Australian Dental Journal*. 2013; 58: 207-212
- [4] Heshmat H, Ganjkar MH, Jaberi S, Fard MJK. The effect of Remin Pro and MI Paste Plus on bleached enamel surface roughness. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*. 2014; 11(2): 131-136
- [5] Amaral CM, Miranda MESNG, Correa DS, Silva EM. Sodium fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate cream plus sodium fluoride efficacy in preventing enamel erosion in a simulated oral environment study model. *Indian Journal of Dental Research*. 2014; 25(4): 464-469
- [6] Rezvani MB, Karimi M, Rasoolzade RA, Haghgoo R. Comparing the effects of whey extract and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on enamel microhardness. *Journal of Dentistry Shiraz University of Medical Sciences*. 2015; 16(1): 49-53
- [7] Ferrazzano GF, Cantile T, Quarto M, Ingenito A, Chianese L, Addeo F. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Australian Dental Journal*. 2008; 53(4): 314-319
- [8] Divyapriya GK, Yavagal PC, Veeresh DJ. Review article casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate in dentistry: an update. *International Journal of Oral Health Sciences*. 2016; 6: 18-25
- [9] Özkan P, Kansu G, Özak ŞT, Yilmaz SK, Kansu P. Effect of bleaching agents and whitening dentifrices on the surface roughness of human teeth enamel. *Journal Acta Odontologica Scandinavica*. 2013; 71: 488 – 497.
- [10] Alaghemand H, Kamangar SSH, Zarenegad N, Tabari N, Abedi H, Khafri S. In-vitro effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel susceptibility to staining by tea during bleaching treatment. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*. 2015; 13(8): 607 – 613.
- [11] Mettu S, Srinivas N, Sampath R, Srinivas N. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on caries-like lesion in terms of time and nano-hardness an in vitro study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2016; 33(4): 269 – 273.
- [12] Ambarkova V, Goršeta K, Glavina D, Škrinjaric' I. The effect of fluoridated dentifrice formulations on enamel remineralization an microhardness after in vitro demineralization. *Acta Stomatologica Croatica*. 2012; 45(3): 169 – 175.
- [13] Alencar CRB, Magalhães AC, Machado MAAM, Oliveira TM, Honório HM, Rios D. In situ effect of a commercial CPP-ACP chewing gum on the human enamel initial erosion. *Journal of Dentistry*. 2015; 42: 1502 – 1507.
- [14] Walsh LJ. Contemporary technologies for remineralization therapied: A Review. *International Dentistry SA*. 2009; 11(6): 6-16