

PENGARUH LAMA EKSTRAKSI MENGGUNAKAN NaOH TERHADAP KARAKTERISTIK NANOKALSIUM DARI TULANG SOTONG (*Sepia sp.*)

Nurfitri Lutfiah Sufiani^{a*}, Retno Ayu Kurniasih^a, Slamet Suharto^a

^aProgram Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah

*Koresponden penulis: nurfitrilutfiah@gmail.com

Abstrak

Peningkatan proporsi kalsium pada nanokalsium tulang sotong dapat dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan NaOH. Proses ekstraksi dengan menggunakan NaOH akan melarutkan protein dan lemak sehingga proporsi kalsium pada bahan akan meningkat. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh perbedaan lama ekstraksi menggunakan NaOH terhadap karakteristik nanokalsium tulang sotong, mengetahui ukuran partikel dari nanokalsium tulang sotong dan menentukan lama ekstraksi dalam mendapatkan nanokalsium tulang sotong dengan rasio kalsium dan fosfor terbaik. Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data diolah menggunakan SPSS 16. Data parametrik dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk melihat perlakuan mana yang berbeda. Perlakuan penelitian adalah lama ekstraksi menggunakan NaOH 1 jam, 2 jam, dan 3 jam. Parameter yang diujikan adalah rendemen, kadar kalsium, kadar fosfor, derajat putih, kadar air, kadar protein, kadar lemak, kadar abu dan ukuran partikel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama ekstraksi (hingga 3 jam) dapat meningkatkan nilai rendemen, kadar kalsium, kadar fosfor, derajat putih dan kadar abu, tetapi menurunkan nilai kadar protein dan kadar lemak ($p < 0,05$). Nanokalsium tulang sotong dengan lama ekstraksi 1 jam, 2 jam dan 3 jam memiliki rata-rata ukuran partikel berturut-turut 665,5; 686,8; dan 616,4 nm. Berdasarkan hasil penelitian dengan kesimpulan bahwa rasio kalsium dan fosfor tertinggi dihasilkan melalui lama ekstraksi dengan menggunakan NaOH selama 3 jam dengan perbandingan 148:1.

Kata kunci: Ekstraksi, NaOH, Nanokalsium, Tulang Sotong

Abstract

Increasing the proportion of calcium in cuttlefish bone nanocalcium can be conducted by extraction method using NaOH. The extraction process using NaOH will dissolve protein and lipid so that the proportion of calcium in the material will increase. This research were aimed to examine the effect of differences in time extraction using NaOH on the content and characteristics of nanocalcium cuttlefish bone, determine the particle size of nanocalcium cuttlefish bone and determine the extraction time in obtaining nanocalcium cuttlefish bone with the best ratio of calcium and phosphorus. The research method used was a Completely Randomized Design model and the data were processed using SPSS 16. Parametric data were analyzed using ANOVA and Honest Real Difference test. The research treatments were different durations of calcium extraction using NaOH, namely 1 h, 2 hrs, and 3 hrs. The parameters tested were yield, calcium content, phosphorus content, whiteness degree, moisture content, protein content, lipid content, ash content and particle size. The results showed that the longer the extraction (up to 3 hrs) can increase the yield, calcium content, phosphorus content, whiteness, and ash content, but decrease the protein content and lipid content ($p < 0.05$). Nanocalcium cuttlefish bone with extraction times of 1 h, 2 hrs, and 3 hrs had different average particle sizes, that is 665.5; 686.8; and 616.4 nm. Based on the results of the study, it was concluded that the highest ratio of calcium and phosphorus was obtained through extraction time using NaOH for 3 hrs with a ratio of 148:1.

Keywords: Extraction, NaOH, Nanocalcium, Cuttlefish Bone

PENDAHULUAN

Sotong (*Sepia sp.*) merupakan hasil perikanan tangkap yang termasuk kelas

Cephalopoda. Berdasarkan data KKP [1], produksi perikanan tangkap *Cephalopoda* di Indonesia meliputi cumi-cumi, gurita dan sotong. Data volume ekspor sotong tahun 2016

Article history:

Diterima / Received 20 January 2022

Disetujui / Accepted 10 May 2022

Diterbitkan / Published 12 May 2022

©2022 at <http://jfmr.ub.ac.id>

mencapai 25,92 ton dan mengalami peningkatan menjadi 33,16 ton pada tahun 2017 atau mengalami peningkatan sebesar 7,24%; namun dalam proses pengolahannya, sotong hanya dimanfaatkan bagian daging, sedangkan tulang dan jeroan dianggap sebagai limbah samping hasil pengolahan.

Tulang sotong memiliki kandungan kalsium yang cukup tinggi tetapi saat ini pemanfaatannya hanya sebatas sebagai pakan burung. Informasi mengenai pengolahan tulang sotong menjadi produk lain saat ini masih terbatas. Tulang sotong diketahui memiliki unsur anorganik mencapai 75-90% yang sebagian besarnya merupakan kalsium karbonat. Berdasarkan data tersebut maka diperlukan upaya untuk meningkatkan pemanfaatan tulang sotong salah satunya adalah dengan mengolah tulang sotong menjadi nanokalsium [2].

Kalsium yang terdapat dapat pada tulang sotong dapat dengan mudah diserap oleh tubuh manusia apabila kalsium dan fosfor memiliki rasio yang tepat dan dikonsumsi dalam ukuran nano. Tulang sotong tersusun atas beberapa mineral diantaranya adalah kalsium karbonat. Kalsium karbonat diserap dengan baik dan ditoleransi pada sebagian besar individu ketika dikonsumsi dengan makanan [3]. Asupkan kalsium harian yang dibutuhkan untuk memenuhi angka kecukupan gizi adalah 1000 mg. Pengolahan tulang sotong menjadi nanokalsium merupakan upaya peningkatan agar kalsium dapat terabsorpsi secara optimal dalam tubuh. Suatu partikel dapat dikatakan berukuran nano apabila memiliki ukuran antara 1 s.d. 1000 nm sehingga diharapkan mampu memberikan aktivitas yang baik [4]. Nanokalsium tulang sotong didapatkan melalui ekstraksi dan penepungan.

Proses ekstraksi umumnya menggunakan basa kuat seperti NaOH pada waktu dan suhu tertentu dengan tujuan menghilangkan protein dan lemak pada tulang. Penghilangan protein dan lemak bertujuan untuk memperpanjang umur simpan produk serta meningkatkan derajat putih pada tepung tulang. Larutan basa panas lebih efektif untuk menghidrolisis protein pada tulang. Penggunaan larutan NaOH pada pembuatan tepung tulang akan memungkinkan banyaknya kalsium yang mengendap dalam matrik-matrik tulang serta menghasilkan fraksi larut dan fraksi tidak larut dengan warna yang lebih putih [5].

Pemanfaatan nanokalsium dan tulang sotong pada bidang pangan, pakan, dan kosmetik saat

ini sudah cukup luas dan semakin diminati para peneliti diantaranya adalah penambahan nanokalsium tulang cakalang terhadap kualitas kerupuk cakalang [6], nanokalsium tulang nila sebagai bahan tambahan pada bubuk *flavor* rajungan [7], tepung tulang sotong sebagai bahan tambahan pada ransum ayam pedaging [8], pemanfaatan tepung tulang sotong dalam pembuatan tabir surya [9], dan tepung tulang sotong untuk peningkatan kualitas gel surimi [10]. Namun, saat ini belum ada penelitian yang menentukan waktu optimal dalam ekstraksi kalsium dari tulang sotong dengan menggunakan NaOH.

Berdasarkan uraian diatas perlu adanya penelitian mengenai ekstraksi kalsium dari tulang sotong menggunakan larutan NaOH. Ekstraksi dengan menggunakan NaOH merupakan salah satu cara dalam meningkatkan kandungan kalsium pada tepung tulang sotong. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh perbedaan lama ekstraksi menggunakan NaOH terhadap karakteristik nanokalsium tulang sotong, mengetahui ukuran partikel dari nanokalsium tulang sotong dan menentukan lama ekstraksi dalam mendapatkan nanokalsium tulang sotong dengan rasio kalsium dan fosfor terbaik.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tulang sotong kering yang didapatkan dari toko pakan burung dan berukuran panjang 20 cm, NaOH 1,5N (*Merck, Germany*) serta aquades. Alat yang digunakan antara lain oven (*Binder ED 53, Germany*), ballmill (*Fritsch Planetary tipe mono mill pulverisette 6, Germany*), atomic absorption spectroscopy (AAS) (*Shimadzu AA-6200, Japan*), spektrofotometer (*Shimadzu Spektrofotometer UV-1201, Japan*), Colorimeter (*3nh Colorimeter NH310, China*) alat destruksi (*Gerhardt Turbotherm Rapid Digestion Unit, Indonesia*), alat destilasi (*Foss KT 200 Kjeltex™, Denmark*), ekstraktor soxhlet (*Foss ST 243 Soxtec™, Denmark*), tungku pengabuan (*Thermolyne F6010, Amerika*), Particle Size Analyzer (*Zetasizer nano ZEN3600, UK*). Metode penelitian yang digunakan adalah metode *experimental laboratories* dan dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Teknologi Hasil Perikanan, Unoversitas Diponegoro.

Metode Pembuatan Nanokalsium

Proses pembuatan nanokalsium tulang sotong (*Sepia* sp.) dengan perbedaan lama ekstraksi mengacu kepada Lekahena *et al.* [11], dengan modifikasi lama waktu ekstraksi dan konsentrasi NaOH. Pembuatan nanokalsium diawali dengan membersihkan tulang sotong yang kemudian diproses menjadi serpihan kasar. Tulang sotong selanjutnya di ekstraksi menggunakan NaOH 1,5N dengan perbandingan antara tulang sotong dan larutan adalah 1:3 pada suhu 100°C selama 1, 2 dan 3 jam dengan pergantian larutan per 1 jam. Tulang sotong selanjutnya didinginkan pada suhu ruang kemudian dilakukan pencucian dengan menggunakan air mengalir hingga pH tulang sotong netral. Tulang sotong dengan pH netral selanjutnya dioven selama 12 jam pada suhu 50°C (KA<8%). Agar menghasilkan tulang sotong berukuran nano maka tulang sotong yang telah kering dihaluskan menggunakan ballmill dengan ukuran 200 mesh selama 2 jam.

Pengujian Rendemen

Rendemen dihitung dengan membandingkan berat nanokalsium dengan berat tulang sotong kering kemudian dikalikan dengan 100% [12].

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat Akhir (g)}}{\text{Berat Awal (g)}} \times 100\%$$

Pengujian Kadar Kalsium

Sampel ditimbang ± 5 g kemudian diabukan. Abu tersebut di destruksi dengan ditambahkan HNO₃ : H₂O (10:3) selama ± 10 menit. Larutan hasil destruksi didinginkan kemudian disaring dan ditempatkan pada labu takar 50 mL. Larutan tersebut ditambahkan aquademin hingga tanda tera pada labu takar 50 mL. Larutan ini dinamakan larutan indukan. Sampel dilakukan pengenceran dengan cara diambil 0,5 mL larutan indukan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL serta ditambahkan aquademin hingga tanda tera. Tahap pembacaan dengan diambil 0,5 mL larutan yang telah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Sampel ditambahkan 2 mL lantanum dan aquademin hingga tanda tera. Sampel dilakukan pembacaan pada AAS dengan $\lambda = 422,7$ nm. Nilai konsentrasi didapatkan dengan memasukan nilai absorbansi pada persamaan regresi linear [13]. Perhitungan kadar kalsium dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Ca (g/100g) = \frac{C \times I \times P}{W \times 10000}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi hasil pembacaan AAS (ppm)

I = Larutan indukan (mL)

P = Pengenceran

W = Berat sampel (g)

Pengujian Kadar Fosfor

Pengujian kadar fosfor dilakukan dengan pengabuan selama 6 jam pada suhu 550°C sampel sebanyak 2 gram. Sampel yang telah diabukan selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan 30 mL aquademin. Larutan dipanaskan dan disempurnakan (digestion) dengan penambahan HNO₃ setetes demi setetes sampai larutan tidak berwarna, dilanjutkan dengan pemanasan hingga timbul asap putih dan didinginkan. Sampel dimasukan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan 15 mL aquades dan dididihkan kembali selama 10 menit. Sebanyak 10 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Kemudian di dalam labu takar ditambahkan 40 mL aquades dan 25 mL pereaksi vanadatmolibdat dan diencerkan sampai tanda tera. Nilai absorbansi larutan tersebut diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Nilai konsentrasi didapatkan dengan memasukan nilai absorbansi pada persamaan regresi linear [14]. Perhitungan kadar fosfor dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$P_1 (mg/kg) = \frac{C \times I \times P}{W}$$

$$P_2 (g/100g) = \frac{P_1}{10000}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi hasil perhitungan persamaan linier (ppm)

I = Larutan indukan (mL)

P = Pengenceran

W = berat sampel (g)

Pengujian Derajat Putih

Pengujian warna dilakukan dengan menggunakan alat colorimeter dimana diperoleh data hasil pengujian yaitu L, a dan b. Sebelum mulai pengukuran, dilakukan standarisasi dengan diukur warna putih pada kertas [15]. Perhitungan derajat putih dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$W = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{0.5}$$

Keterangan :

W = derajat putih, diasumsikan nilai 100 adalah yang paling sempurna

L = nilai yang ditunjukkan oleh kecerahan

a = warna merah (+) dan hijau (-)

b = warna kuning (+) dan biru (-)

Pengujian Kadar Air

Pengujian kadar air berdasarkan SNI 01-2354.2-2006 dilakukan dengan mengkondisikan oven pada suhu yang digunakan hingga mencapai kondisi stabil. Cawan kosong dimasukkan ke dalam oven minimal 1,5 jam. Cawan kosong dipindahkan ke dalam desikator sekitar 30 menit sampai mencapai suhu ruang dan timbang bobot kosong (W_0). Sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak ± 2 g dan dimasukkan ke dalam cawan (W_1). Cawan yang telah diisi dengan sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 16 s.d. 24 jam hingga berat kering konstan. Cawan dipindahkan dengan menggunakan alat penjepit ke dalam desikator selama ± 30 menit kemudian ditimbang (W_2). Pengujian dilakukan minimal duplo (dua kali) [16]. Perhitungan kadar air dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\%Kadar\ Air = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = berat cawan kosong dalam g;

W_1 = berat cawan + contoh awal dalam g;

W_2 = berat cawan + contoh kering, dalam g.

Pengujian Kadar Protein

Pengujian kadar protein metode total nitrogen berdasarkan SNI 01-2354.4-2006 dilakukan dengan sampel ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu destruksi 50 mL, lalu ditambahkan 3,5 g K_2SO_4 , CuSO_4 0,4 g dan 15 mL H_2SO_4 pekat ditambahkan secara perlahan ke dalam labu dan didiamkan 10 menit di ruang asam. Sampel didestruksi pada suhu 410°C selama kurang lebih 2 jam atau sampai cairan berwarna hijau bening.

Selanjutnya siapkan erlenmeyer 250 mL yang berisi 25 mL asam borat (H_3BO_3) 4 % yang mengandung indikator *bromcherosol green* 0.1 % dan *methyl red* 0,1 % dengan perbandingan 2:1. Destilasi dilakukan dengan menambahkan 70 mL aquades dan 60mL larutan NaOH 45% ke dalam alat destilasi

hingga hasil destilat berwarna hijau. Lalu destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai terjadi perubahan warna merah muda yang pertama kalinya. Volume titran dibaca dan dicatat [17]. Rumus perhitungan kadar protein dianalisa dengan rumus:

$$\%N = \frac{(mL\ contoh - mL\ blanko) \times N\ HCl \times 14,007}{g\ contoh} \times 100\%$$

$$\%Kadar\ Protein\ (bb) = \%N \times 6,25\ (FK)$$

$$\% (bk) = \frac{100}{100 - \%kadar\ air} \times \% (bb)$$

Keterangan:

N HCl = Normalitas HCl

14,007 = Berat atom nitrogen

% N = Kadar nitrogen total

N dalam protein sebesar 16% sehingga FK = $100/16 = 6,25$

Pengujian Kadar Lemak

Penentuan kadar lemak berdasarkan SNI 01-2354-2017 dilakukan dengan metode soxhlet yang diawali dengan tahapan hidrolisis. 1-3 g sampel ditimbang dalam (W_0). Selanjutnya yaitu ekstraksi menggunakan ekstraktor Soxhlet konvensional. Tahap pertama yaitu menimbang labu alas bulat kosong (W_1). 50 mL n-heksana masuk ke dalam labu alas bulat. Selongsong lemak dimasukkan ke dalam ekstraktor Soxhlet. Ekstraksi dilakukan dengan siklus ekstraksi sekitar 5 menit/siklus selama 3-4 jam. Pelarut n-heksana diuapkan dalam labu alas bulat sampai kering. Labu alas bulat yang berisi lemak dimasukkan ke dalam oven suhu 105°C selama ± 2 jam untuk menghilangkan sisa heksana dan uap air. Labu alas bulat yang berisi lemak didinginkan di dalam desikator selama 30 menit. Berat labu alas bulat yang berisi lemak (W_2) ditimbang sampai berat konstan [18]. Penentuan kadar lemak dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\%Kadar\ Lemak\ (bb) = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100\%$$

$$\% (bk) = \frac{100}{100 - \%kadar\ air} \times \% (bb)$$

Keterangan:

W_0 = berat sampel (g)

W_1 = berat labu alas bulat atau erlenmeyer atau cawan aluminium kosong (g)

W_2 = berat labu alas bulat kosong dan lemak hasil ekstraksi (g)

Pengujian Kadar Abu

Pengujian kadar abu metode gravimetri berdasarkan SNI 01-2354.1-2006 dilakukan dengan memasukan cawan abu porselin kosong dalam tungku pengabuan. Suhu dinaikan secara bertahap sampai suhu 550°C. pertahankan suhu 550°C ± 5°C selama 1 malam. Suhu pengabuan diturunkan menjadi sekitar 40°C, keluarkan cawan abu porselin dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang berat cawan abu porselin kosong (W_0). Sampel seberat 2 g dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100°C selama 22 jam. Cawan abu porselin dipindahkan ke tungku pengabuan dan temperatur dinaikkan secara bertahap sampai suhu mencapai 550°C ± 5°C, dipertahankan selama 8 jam/semalam sampai diperoleh abu berwarna putih. Setelah selesai, tungku pengabuan diturunkan suhunya menjadi 40°C, keluarkan cawan porselin dengan menggunakan penjepit dan masukkan ke dalam desikator selama 30 menit. Bila abu belum putih benar harus dilakukan pengabuan kembali. Abu dibasahi (lembapkan) dengan aquades secara perlahan, keringkan pada hot plate dan diabukan kembali pada suhu 550°C sampai berat konstan. Suhu pengabuan diturunkan menjadi ± 40°C lalu pindahkan cawan abu porselin dalam desikator selama 30 menit kemudian ditimbang beratnya (W_1) segera setelah dingin. Lakukan pengujian minimal duplo (dua kali) [19]. Perhitungan kadar abu dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \%Kadar\ Abu\ (bb) \\ = \frac{W_1 - W_0}{Berat\ sampel\ (g)} \times 100\% \end{aligned}$$

$$\% (bk) = \frac{100}{100 - \%kadar\ air} \times \% (bb)$$

Keterangan:

W_0 = berat cawan porselin (g)

W_1 = berat cawan dengan abu (g)

Pengujian Ukuran Partikel

Analisa PSA digunakan untuk mengetahui ukuran dari suatu sampel. Alat yang digunakan pada pengukuran PSA yaitu Zetasizer Nano yang memiliki skala pembacaan 0,3 nm s.d. 10 µm. Partikel didispersikan ke dalam media cair dan ukuran partikel yang terukur adalah ukuran dari partikel tunggal [20].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen

Lama ekstraksi 3 jam menghasilkan nilai rendemen tertinggi yaitu 43,32 ± 0,52%, sedangkan dengan lama waktu 1 jam menghasilkan nilai rendemen terendah yaitu 34,71 ± 0,38%. Peningkatan nilai rendemen diakibatkan oleh tekstur bahan baku yang melunak seiring penambahan lama waktu ekstraksi Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian First *et al.* [21], dimana seiring bertambahnya waktu ekstraksi dengan menggunakan HCl, nilai rendemen dari nanokalsium tulang ayam yang dihasilkan mengalami peningkatan. Waktu ekstraksi 1; 1,5; dan 2 jam menghasilkan rendemen nanokalsium tulang ayam sebesar 8,52%, 9,30% dan 14,97%. Semakin lama waktu ekstraksi menghasilkan nilai rendemen yang semakin tinggi, karena adanya kesempatan kontak antara bahan dan pelarut yang semakin besar, namun waktu ekstraksi terlalu lama dapat menyebabkan penurunan rendemen yang diakibatkan oleh kejenuhan larutan [22].

Nilai rendemen pada penelitian ini berkisar antara 34,71 ± 0,38% s.d. 43,32 ± 0,52%. Hasil penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian Rozi dan Ukhty [23] dengan ekstraksi NaOH 1,5 N selama 2 jam rendemen tepung tulang ikan tuna yang dihasilkan adalah sebesar 22,55% tetapi lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai rendemen pada penelitian Fitriana *et al.*, [24], dimana nanokalsium cangkang tiram tanpa melalui proses ekstraksi memiliki nilai rendemen 56,41%. Nilai rendemen nanokalsium tulang ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu perlakuan pada sampel seperti proses preparasi bahan baku, lama waktu ekstraksi, proses penetralan, proses pengeringan, dan jenis pelarut [25].

Kadar Kalsium

Pengujian kadar kalsium pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil antara 33,13% s.d. 38,41%. Tulang sotong kering tanpa melalui proses ekstraksi memiliki kadar kalsium yang lebih rendah yaitu 27,89%. Kadar kalsium pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian tepung tulang ikan tuna sirip kuning dengan ekstraksi selama 2 jam menggunakan NaOH 1,5 N yaitu 20,75% [26]. Perbedaan kadar kalsium ini dipengaruhi oleh adanya perbedaan lama waktu ekstraksi,

pada ekstraksi selama 2 jam protein yang terlarut lebih sedikit jika dibandingkan ekstraksi

Table 1. Karakteristik nanokalsium tulang sotong

Parameter	Lama Ekstraksi (jam)		
	1	2	3
Rendemen (%)	34,71 ± 0,38 ^a	38,33 ± 0,84 ^b	43,32 ± 0,52 ^c
Kadar kalsium (g/100g)	33,13 ± 0,42 ^a	35,47 ± 0,16 ^b	38,41 ± 0,52 ^c
Kadar fosfor (g/100g)	0,16 ± 0,0075 ^a	0,21 ± 0,0049 ^b	0,26 ± 0,0024 ^c
Derajat putih (%)	90,96 ± 0,43 ^a	91,78 ± 0,26 ^{ab}	92,21 ± 0,25 ^b

Keterangan :

- Data merupakan hasil rata-rata tiga kali ulangan ± standar deviasi
- Data yang diikuti dengan tanda huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

selama 3 jam. Kelarutan protein ini berpengaruh terhadap proporsi kalsium pada bahan. Perbedaan kadar kalsium juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan sampel yang digunakan. Jenis ikan yang berbeda berpengaruh terhadap nilai kadar kalsium yang dihasilkan pada tepung tulang ikan [27].

Peningkatan kalsium seiring dengan lama ekstraksi disebabkan oleh semakin banyaknya jumlah protein yang larut selama proses ekstraksi dengan menggunakan NaOH. Proses ekstraksi dengan menggunakan larutan basa dapat membuat kalsium mengendap di dalam matriks tulang dan meningkatkan proporsi kadar kalsium pada bahan.

Kadar Fosfor

Kadar fosfor pada penelitian paling tinggi didapatkan melalui lama ekstraksi 3 jam dengan kadar fosfor 25,89 mg/100g atau 258 mg/kg. Nilai tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan tepung tulang ikan belida pada penelitian Kusumaningrum *et al.* [5] dengan ekstraksi menggunakan NaOH 1,5 N selama 2 jam yaitu 3,98%. Perbedaan kandungan fosfor pada nanokalsium ini dipengaruhi oleh adanya perbedaan sampel yang digunakan. Kandungan fosfor pada produk perikanan umumnya berkisar antara 1000-3000 mg/kg. Keberadaan mineral pada tubuh ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya ukuran ikan dan pakan yang dimakan oleh ikan [28].

Kalsium dan fosfor merupakan mineral yang saling berkaitan sehingga dibutuhkan rasio yang tepat antara kalsium dan fosfor. Berdasarkan hasil penelitian berbanding antara kalsium dan fosfor dengan lama ekstraksi 1, 2 dan 3 jam masing-masing menghasilkan rasio dengan angka 198:1; 168:1; dan 148:1. Rasio untuk absorpsi yang baik memerlukan perbandingan kalsium dan fosfor didalam rongga usus sebesar

1:1 hingga 3:1. Rasio kalsium dan fosfor yang lebih besar dari 3:1 akan menghambat penyerapan kalsium [5]. Sari *et al.* [29] menambahkan bahwa apabila kadar fosfor relatif tinggi terhadap kalsium maka akan diperoleh rasio kalsium : fosfor yang tidak seimbang dan dalam jangka panjang dapat menyebabkan hiperparatiroidisme sekunder, peningkatan resorpsi tulang, dan rendahnya kualitas tulang, terutama jika asupan kalsium tidak memadai. Namun, beberapa produk perikanan tidak sesuai dengan perbandingan ini. Berdasarkan rasio tersebut nanokalsium tulang sotong dapat dikonsumsi sebagai bahan tambahan pangan dengan catatan tidak lebih dari 2 gram dan dikonsumsi bersamaan dengan makanan tinggi fosfor.

Derajat Putih

Pengujian derajat putih pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil antara 90,96% s.d. 92,21%. Perbedaan yang nyata terlihat pada sampel dengan ekstraksi 1 jam dan ekstraksi 3 jam. Lama waktu ekstraksi dapat mempengaruhi warna pada sampel dimana semakin lama proses ekstraksi maka semakin banyak protein dan lemak yang terlarut sehingga sampel yang dihasilkan memiliki warna yang cerah. Hal ini diperkuat oleh Kusumaningrum dan Asikin [30] bahwa, warna putih pada nanokalsium tulang ikan nila melalui proses ekstraksi menggunakan NaOH menghasilkan warna yang lebih putih.

Proses ekstraksi nanokalsium tulang sotong selama 3 jam memberikan nilai derajat putih yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian dengan sampel berupa nanokalsium tulang ikan tuna yang diekstraksi dengan menggunakan NaOH 1,5N selama 6 jam menghasilkan nilai derajat putih sebesar 89,27% [31]. Hal tersebut diduga waktu

ekstraksi yang terlalu lama menyebabkan larutan menjadi jenuh sehingga larutan NaOH

tidak dapat melarutkan lemak secara sempurna dan derajat putih yang dihasilkan lebih rendah.

Table 2. Nilai proksimat nanokalsium tulang sotong

Parameter	Lama Ekstraksi (jam)		
	1	2	3
Kadar air (%)	1,07 ± 0,06 ^a	0,94 ± 0,21 ^a	0,82 ± 0,01 ^a
Kadar protein (%)	bb 2,21 ± 0,37 ^b	1,55 ± 0,13 ^{ab}	1,17 ± 0,07 ^a
Kadar lemak (%)	bb 0,53 ± 0,05 ^c	0,36 ± 0,04 ^b	0,13 ± 1,13 ^a
Kadar Abu (%)	bb 84,93 ± 0,53 ^a	91,06 ± 0,77 ^b	93,02 ± 0,32 ^c
	bk 85,80 ± 0,64 ^a	91,97 ± 0,71 ^b	93,59 ± 0,41 ^b

Keterangan :

- Data merupakan hasil rata-rata tiga kali ulangan ± standar deviasi
- Data yang diikuti dengan tanda huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Kadar Air

Pengujian kadar air pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil 0,82% s.d. 1,07%. Nanokalsium memiliki sifat yang hidroskopis atau mudah mengikat air sehingga kadar air yang tinggi dapat mempersingkat umur penyimpanan dan kualitas produk yang dihasilkan akan menjadi rusak karena adanya pertumbuhan mikroorganisme khususnya kapang. Produk pangan dengan kadar air kurang 14% cukup aman untuk mencegah pertumbuhan kapang, sedangkan kadar air maksimum produk kering seperti tepung adalah 10% [32].

Kadar air berkurang akibat dari terjadinya proses perpindahan panas dan perpindahan massa yang terjadi saat proses pengeringan berlangsung [33]. Kadar air pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Meulisa et al. [26] kadar air tepung tulang ikan tuna sirip kuning dengan ekstraksi NaOH 1,5 N selama 2 jam adalah 7,51% Perbedaan kandungan kadar ini ini disebabkan oleh adanya perbedaan bahan baku dan metode pengeringan yang digunakan. Perbedaan kadar air yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh metode pembuatan tepung dan teknik pengeringan tulang serta jenis ikan yang digunakan [34].

Kadar Protein

Kadar protein dihilangkan semaksimal mungkin dengan melakukan proses hidrolisis protein dalam pembuatan tepung tulang [34]. Pengujian kadar protein pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil antara 1,17% s.d. 2,21%. Tulang sotong tanpa melalui proses

ekstraksi memiliki kadar protein yang lebih tinggi yaitu 3,53%. Kadar protein pada penelitian ini jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian yang menggunakan NaOH 1,5 N selama 2 jam pada tepung tulang ikan patin 25,38%, lele 24,24% dan sembilang 25,21% [25]. Hal tersebut dipengaruhi oleh perbedaan sampel yang digunakan serta lama waktu ekstraksi. Kalsium yang diekstraksi secara optimal dapat menurunkan kadar protein pada bahan. NaOH dapat melarutkan protein dan lemak pada tulang ikan dan proses pelarutan protein dan lemak akan semakin besar dengan adanya suhu ekstraksi yang berperan sebagai katalis (mempercepat reaksi) [25].

Rendahnya kadar protein pada tepung tulang dapat menguntungkan dan merugikan bila dilihat dari aspek gizi maupun penyerapan kalsium dalam usus. Protein berperan dalam penyerapan kalsium dalam mukosa usus, tetapi protein pada tulang ikan umumnya terdiri dari protein fibriler yang sulit dicerna oleh enzim pepsin dan pankreatin. Oleh karena itu perlu adanya proses hidrolisis dan pelarutan protein dengan pemanasan [36].

Kadar Lemak

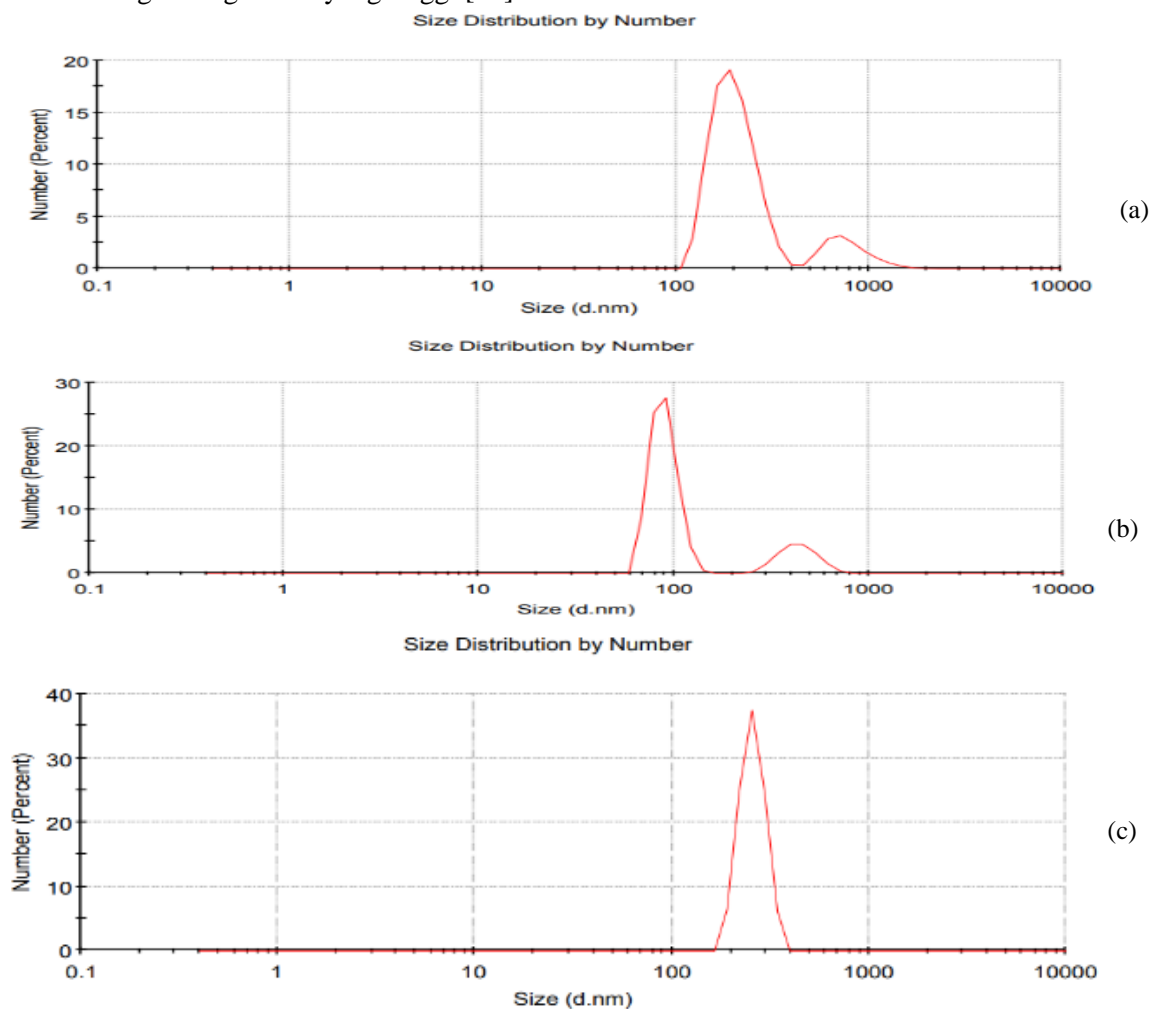
Lemak merupakan komponen organik yang jumlahnya harus ditekan untuk menghasilkan produk tepung tulang yang baik. Pengujian kadar lemak pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil antara 0,13% s.d. 0,53%. Tulang sotong tanpa melalui proses ekstraksi memiliki kadar lemak yang lebih tinggi yaitu 0,8%. Penurunan kadar lemak seiring dengan

lama waktu ekstraksi menunjukkan bahwa suhu tinggi dan penggunaan larutan alkali dapat mengoksidasi lemak. Kadar lemak yang rendah terjadi pada saat proses ekstraksi dengan menggunakan NaOH, hal ini dikarenakan lemak larut saat proses ekstraksi [37].

Kadar lemak yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan NaOH 1,5 N selama 2 jam pada tepung tulang ikan belida 0,38% [34] dan tepung tulang ikan kambing-kambing 0,64% [37]. Perbedaan kadar lemak dipengaruhi oleh banyak faktor salah satunya adalah perbedaan jenis spesies dan ukuran spesies yang digunakan. Kadar lemak dalam tulang erat hubungan dengan lemak tubuh setiap spesies, dan biasanya ikan yang besar dan dewasa mengandung lemak yang tinggi [38].

Kadar Abu

Pengujian kadar abu pada nanokalsium tulang sotong didapatkan hasil antara 84,93% s.d. 93,02%. Hasil penelitian ini sejalan dengan kadar abu pada penelitian yang menggunakan NaOH 1,5 N selama 2 jam kadar abu tepung tulang ikan belida yang dihasilkan sebesar 88,52% [34]. Peningkatan kadar abu sejalan dengan lama ekstraksi yang dilakukan. Peningkatan lama ekstraksi dan akan cenderung meningkatkan kadar abu karena semakin lama waktu ekstraksi akan semakin lama produk berhubungan dengan pelarut dan sebagai akibatnya akan semakin banyak komponen nonmineral yang terlarut [39].



Gambar 1. Distribusi ukuran partikel nanokalsium (a) lama ekstraksi 1 jam; (b) lama ekstraksi 2 jam; (c) lama ekstraksi 3 jam.

Ukuran Partikel

Berdasarkan hasil pengujian yang tersaji pada Gambar 1. ukuran partikel untuk tepung kalsium dari tulang sotong berkisar antara

616,4 s.d. 686,8 nm. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa sampel berukuran nanopartikel karena memiliki ukuran partikel di bawah 1000 nm. Nanokalsium mempunyai

ukuran yang sangat kecil 10 hingga 1000 nm yang menyebabkan reseptor dengan cepat masuk kedalam tubuh dengan sempurna sehingga nanokalsium hampir bisa diserap oleh tubuh 100% [40].

Distribusi ukuran partikel (a) adalah 13,9% partikel berukuran 785,4 nm dengan standar deviasi 226,6; 86,1% partikel berukuran 203,4 nm dengan standar deviasi 53,89; dan 0,0% partikel berukuran 5590 nm dengan standar deviasi 579,8 sehingga total rata-rata ukuran partikel adalah 665,5 nm. Distribusi ukuran partikel (b) adalah 19,2% partikel berukuran 440,3 nm dengan standar deviasi 98,40 dan 80,8% partikel berukuran 89,41 nm dengan standar deviasi 14,35 sehingga total rata-rata ukuran partikel adalah 686,8 nm. Distribusi ukuran partikel (c) adalah 100% partikel berukuran 257,4 nm dengan standar deviasi 37,99 dan total rata-rata ukuran partikel adalah 616,4 nm. Berdasarkan uraian diatas ukuran partikel dengan lama ekstraksi 3 jam memiliki distribusi yang lebih merata. Pembentukan nanokalsium disebabkan oleh proses pengendapan yang menghasilkan endapan kalsium yang halus dan berukuran nano. Proses pelunakan tulang menggunakan pelarut pada suhu tinggi dapat mengubah tekstur tulang [41].

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian nanokalsium tulang sotong dengan perbedaan lama ekstraksi adalah:

1. Lama ekstraksi dengan menggunakan NaOH meningkatkan nilai rendemen, derajat putih, kalsium, fosfor dan abu serta menurunkan kadar protein dan lemak;
2. Tepung tulang sotong menghasilkan rata-rata ukuran partikel yang berkisar antara 616,4 s.d. 686,8 nm, sehingga dapat disebut sebagai nanokalsium; dan
3. Lama ekstraksi terbaik terhadap nanokalsium tulang sotong adalah ekstraksi kalsium dengan lama waktu 3 jam karena nanokalsium yang dihasilkan memiliki rasio kalsium dan dan fosfor yang mendekati 3:1 yaitu 148:1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada seluruh pihak yang telah membantu penelitian ini serta seluruh dosen departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro atas ilmu yang telah diberikan sehingga peneliti dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2018, 19 Okt). Kinerja ekspor produk perikanan Indonesia tahun 2018. [Online]. Tersedia: <https://kkp.go.id/djpdspkp/artikel/7947-kinerja-ekspor-produk-perikanan-indonesia-tahun-2018>
- [2]. K. U. Henggu, B. Ibrahim, dan P. Suptijah, "Hidroksiapatit dari cangkang sotong sebagai sediaan biomaterial perancah tulang," *JPHPI.*, vol. 22, no. 1, hal. 1-13, 2019
- [3] A. Trailokya, A. Srivastava, M. Bhole, and N. Zalte, "Calcium and calcium salts," *Journal of The Association of Physicians of India.*, vol. 65, pp. 100-103, 2017
- [4] Y. Farida, D. Rahmat, dan A. G. Amanda, "Uji aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan metode penghambatan denaturasi protein," *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.*, vol. 16, no. 2, hal. 225-230, 2018.
- [5] I. Kusumaningrum, D. Sustono, dan B. F. Pamungkas, "Pemanfaatan tulang ikan belida sebagai tepung sumber kalsium dengan metode alkali," *JPHPI.*, vol. 19, no. 2, hal. 148-155, 2016.
- [6] R. M. Harmain, F. A. Dali, dan R. Husain, "Physical analyze and hedonic quality of ilabulo crackers skipjack (*Katsuwonus pelamis*) fortified nano

- calcium bone,” *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.*, vol. 278, hal. 1-5, 2019
- [7] I. Wijayanti, and E. N. Dewi, “The characteristics of nanocalcium flavor powder made from waste stewed water of swimming crab *Portunus pelagicus* L,” *The 5th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development.*, vol. 530, pp. 1-8, 2020.
- [8] D. Widharto, dan W. Marsudi, “Pengaruh penambahan tepung tulang sotong (*cuttelfish bone*) dalam ransum terhadap konsumsi pakan, penambahan bobot badan, dan karkas ayam pedaging,” *Agrisaintifika.*, vol. 1, no. 2, hal. 132-139, 2017.
- [9] M. M. Lovianie, “Pembuatan lotion tabir surya tepung tulang sotong (*Sepia officinalis*) dengan perbandingan emulgator,” *Jurnal Borneo Cendekia.*, vol. 1, no. 2, hal. 262-268, 2017.
- [10] J. Kim, M. Cho and M. Heu, “quality improvement of heat-induced surimi gel using calcium powder of cuttle, *sepia esculenta* bone treated with acetic acid,” *J. Kor. Fish. Soc.*, vol. 36, no. 3, pp. 198-203, 2003.
- [11] V. Lekahena, D. N. Faridah, R. Syarief, dan R. Peranginangin, “Karakteristik fisikokimia nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan nila menggunakan larutan basa dan asam,” *Jurnal Teknologi dan Indusri Pangan.*, vol. 25, no. 1, hal. 57-64, 2014.
- [12] J. Venkatesan, and S. K. Kim, “Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (*Thunnus obesus*) bone,” *Material.*, vol. 3, pp. 4761-4772, 2010.
- [13] A. Marzuki, Y. Fujaya, M. Rusydi, dan Haslina, “Analisis kandungan kalsium (Ca) dan besi (Fe) pada kepiting bakau (*Scylla olivacea*) cangkang keras dan cangkang lunak dengan metode spektrofotometri serapan atom,” *Majalah Farmasi dan Farmakologi.*, vol. 17, no. 2, hal. 31-34, 2013.
- [14] S. E. Ratnawati, W. A. Tri, dan H. Johannes, “Penilaian hedonik dan perilaku konsumen terhadap *snack* yang difortifikasi tepung cangkang kerang simping (*Amusium* sp.),” *Jurnal Ilmiah Perikanan.*, vol. 15, no. 2, hal. 88-103, 2014.
- [15] R. T. Mawarni dan S. B. Widjanarko, “Penggilingan metode ball mill dengan pemurnian kimia terhadap penurunan oksalat tepung porang,” *Jurnal Pangan dan Agroindustri.*, vol. 3, no. 2, hal. 571-581, 2015.
- [16] Badan Standarisasi Nasional [BSN]. “SNI no. 01-2354.2-2006 tentang penentuan kadar air pada produk perikanan.” *Badan Standarisasi Nasional.*, Jakarta, 2006.
- [17] Badan Standarisasi Nasional [BSN]. “SNI no. 01-2354-4-2006 tentang penentuan kadar protein dengan metode total nitrogen pada produk perikanan.” *Badan Standarisasi Nasional.*, Jakarta, 2006.
- [18] Badan Standarisasi Nasional [BSN]. “SNI no. 01-2354-2017 tentang penentuan kadar lemak total pada produk perikanan.” *Badan Standarisasi Nasional.*, Jakarta, 2017.
- [19] Badan Standarisasi Nasional [BSN]. “SNI no. 01-2354.1-2006 tentang penentuan kadar abu pada produk perikanan.” *Badan Standarisasi Nasional.*, Jakarta, 2006.
- [20] Malvern Instrument Ltd, “Zetasizer nano series user manual,” *Malvern Instrument Ltd.*, United Kingdom, hal. 250, 2013
- [21] L. First, L. R. D. Septaningrum, K. Pangestuti, Jufrinaldi, R. Hidayat, dan D. Khosilawati, “Sintesis dan karakteristik nano kalsium dari limbah tulang ayam broiler dengan metode

- presipitasi,” *Jurnal Ilmiah Teknik Kimia.*, vol. 3, no. 2, hal. 69-73, 2019.
- [22] J. Brojer, H. Stamfli, and T. Graham, “Effect of extraction time and acid concentration on the separation of proglycogen and macroglycogen in horse muscle samples,” *Canadian Journal of Veterinary Research.*, vol. 66, no. 3, pp. 201-206, 2002.
- [23] A. Rozi dan N. Ukhty, “Karakteristik tepung tulang ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) sebagai sumber kalsium dengan perlakuan suhu pengeringan yang berbeda,” *Jurnal Fishtech.*, vol. 10, no. 1, hal. 25-34, 2021.
- [24] N. Fitriana, L. Handayani, dan Nurhayati, “Penambahan nanokalsium cangkang tiram (*Crassostrea gigas*) pada pakan dengan dosis berbeda terhadap pertumbuhan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*),” *Acta Aquatica.*, vol. 6, no. 2, hal. 80-85, 2019.
- [25] P. D. Anggraeni, Y. S. Darmanto, dan A. S. Fahmi, “Pengaruh penambahan nanokalsium tulang ikan yang berbeda terhadap karakteristik beras analog umbi gembili (*Dioscorea esculenta*) dan rumput laut *Eucheuma spinosum*,” *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan.*, vol. 1, no. 1, hal. 55-64, 2019.
- [26] A. I. Meulisa, A. Rozi, dan S. Zuraidah, “Kajian mutu kimiawi tepung tulang ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dengan suhu pengeringan yang berbeda,” *Jurnal Perikanan Tropis.*, vol. 8, no. 1, hal. 35-43, 2021.
- [27] M. Nemati, N. Huda, and F. Ariffin, “Development of calcium supplement from fish bone wastes of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and characterization of nutritional quality,” *International Food Research Journal.*, vol. 24, no. 6, pp. 2419-2426, 2017.
- [28] T. Nurhayati, Nurjanah, dan A. H. Zamzami, “Komposisi mineral makro dan logam berat pada ikan bandeng dari tambak Tanjung Pasir Kabupaten Tangerang,” *Depik.*, vol. 3, no. 3, hal. 234-240, 2014.
- [29] E. M. Sari, M. juffrie, N. Nurani, dan M. N. Sitaresmi, “Asupan protein, kalsium dan fosfor pada anak *stunting* dan tidak *stunting* usia 24-59 bulan,” *Jurnal Gizi Klinik Indonesia.*, vol. 12, no. 4, hal. 152-159, 2016.
- [30] I. Kusumaningrum dan A. N. Asikin, “Pengaruh lama pemrestoan dan frekuensi perebusan terhadap komposisi kimia tepung tulang ikan belida (*Chitala* sp.)” *Prosiding Seminar Nasional Ke 1 Tahun 2017. Balai Riset Dan Standarisasi Industri, Samarinda.*, hal. 180– 187, 2017.
- [31] W. V. Prinaldi, P. Suptijah, dan Uju, “Karakteristik sifat fisikokimia nanokalsium ekstrak tulang ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*),” *JPHPI.*, vol. 21, no. 3, hal. 385-395, 2018.
- [32] M. Lisa, M. Lutfi, dan B. Susilo, “Pengaruh suhu dan lama pengeringan terhadap mutu tepung jamur tiram putih (*Plaerotus ostreatus*),” *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem.*, vol. 3, no. 3, hal. 270-279, 2015.
- [33] Zuhra, Sofyana, dan C. Erlina, “Pengaruh kondisi operasi alat pengering semprot terhadap kualitas susu bubuk jagung,” *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan.*, vol. 9, no.1, hal. 36-44, 2012.
- [34] H. F. Putranto, A. N. Asikin, dan I. Kusumaningrum, “Karakteristik tepung tulang ikan belida (*Chitala* sp.) sebagai sumber kalsium dengan metode hidrolisis protein,” *Ziraa’ah.*, vol. 40, no. 1, hal. 11-20, 2015.
- [35] Y. Cucikodana, A. Supriadi, dan B. Purwanto, “Pengaruh perbedaan suhu perebusan dan konsentrasi NaOH terhadap kualitas bubuk tulang ikan

- gabus (*Channa striata*),” *Fishtech*, vol. 1, no. 1, hal. 91-101, 2012.
- [36] W. Trilaksani, E. Salamah, dan M. Nabil, “Pemanfaatan limbah tulang ikan tuna (*Thunnus* sp.) sebagai sumber kalsium dengan metode hidrolisis protein” *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, vol. 9, no. 2, hal. 34-45, 2006.
- [37] A. Husna, A., L. Handayani dan F. Syahputra, “Pemanfaatan tulang ikan kambing-kambing (*Abalistes stellaris*) sebagai sumber kalsium pada produk tepung tulang ikan” *Acta Aquatica.*, vol. 7, no. 1, hal. 13-20, 2020.
- [38] J. Toppe, S. Albrektsen, B. Hope, and A. Aksnes, “Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species,” *Comparative Biochemical and Physiology.*, vol. 146B, pp. 395-401, 2007.
- [39] J. Basmal, R. H. Suprpto, dan Murtiningrum, “Penelitian ekstraksi kalsium dari tulang ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis* L.),” *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia.*, vol. 6, no. 1, hal. 45-53, 2000.
- [40] T. Aminingsih, S. Y. S. Rahayu, and Y. Yulianita, “Formulation of instant granule containing nano calcium from the shell freshwater mussels (*Anodonta woodiana*) for autism children,” *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology.*, vol. 1, no. 1, pp. 49-56, 2018.
- [41] R. A. Kurniasih, Y. S. Darmanto, V. E. Herawati, A. D. Anggo, and P. H. Riyadi, “Effects of different farming locations on biocalcium characteristics of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bones,” *Bioflux.*, vol. 13, no. 6, pp. 3583-3592, 2020.