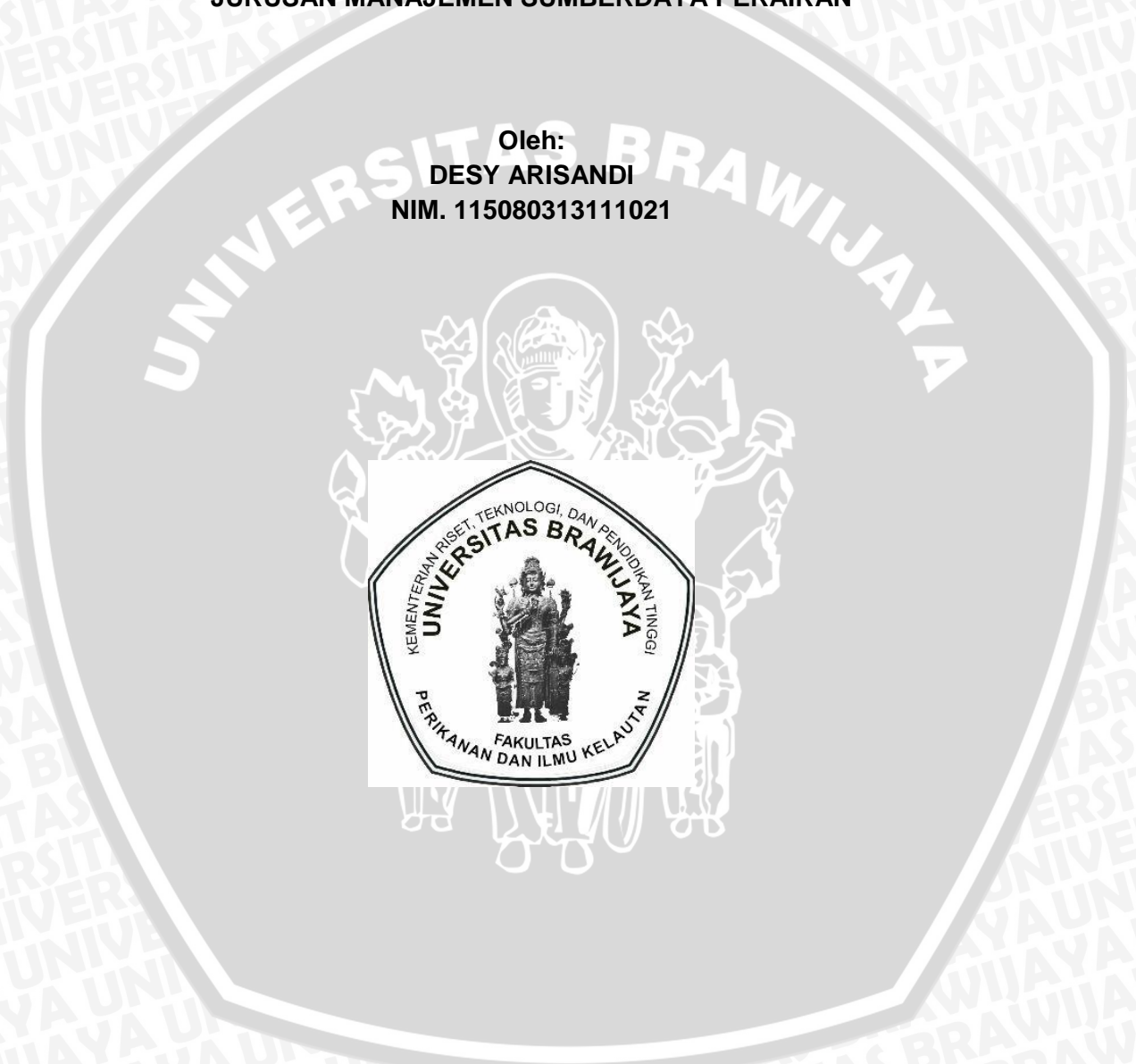


**KARAKTERISASI FISIKOKIMIA DAN BIOAVAILABILITAS NANOKALSIMUM
HASIL EKSTRAKSI TULANG IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)
MENGUNAKAN LARUTAN ASAM**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:
DESY ARISANDI
NIM. 115080313111021



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**



**KARAKTERISASI FISIKOKIMIA DAN BIOAVAILABILITAS NANOKALSIMUM
HASIL EKSTRAKSI TULANG IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)
MENGUNAKAN LARUTAN ASAM**

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

DESY ARISANDI

NIM. 115080313111021



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

SKRIPSI

KARAKTERISASI FISIKOKIMIA DAN BIOAVAILABILITAS NANOKALSIMUM
HASIL EKSTRAKSI TULANG IKAN BANDENG (*Chanos chanos*)
MENGUNAKAN LARUTAN ASAM

Oleh:
DESY ARISANDI
115080313111021

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 25 April 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Yahya, MP)

NIP. 19630706 199003 1 003

Tanggal 30 MAY 2016.....

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Anies Chamidah, MP)

NIP. 19640912 199002 2 001

Tanggal 30 MAY 2016.....

Dosen Penguji II

(Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)

NIP. 19570119 198601 1 001

30 MAY 2016

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Hardoko, MS)

NIP. 19620108 198802 1 001

Tanggal : 30 MAY 2016.....

Mengetahui

Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. Arning Wiluleng Ekawati, MS

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal : 30 MAY 2016.....



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa data skripsi yang saya tulis ini benar- benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Mei 2016

Mahasiswa

Desy Arisandi



UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena dengan rahmat dan ridho-Nya, laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar. Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di fakultas perikanan dan ilmu kelautan, universitas Brawijaya. Atas terselesaikan skripsi ini penulis menyampaikan terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Ibu, kakak dan adik tercinta yang memberikan doa dan dukungan materi serta moril selama penelitian skripsi ini
2. Dr. Ir. Anies Chamidah, MP dan Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahannya dan bimbingan mulai dari penyusunan usulan skripsi sampai selesainya penyusunan laporan skripsi ini
3. Mbak Luluk, Mas Bekti, Mbak Fitri, Bu Vivin, Mas Solih serta seluruh Laboran dari berbagai laboratorium yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya penelitian ini
4. Teman seperjuangan selama proses penelitian Siti Rima serta teman-teman di laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan yang telah banyak membantu
5. Teman-teman sebimbingan tercinta serta teman-teman THP 2011 yang telah membantu dan memberikan motivasi selama ini
6. Teman-teman tempat berlindungku selama di Malang Vida, Erni, Tami, Ratna serta adik-adik Kerto Aji terimakasih atas papannya selama ini
7. Teman-teman Kertosentono 57C mbak Nita, Fitri, Dike, Gesy, Pepy, Wati yang selalu bertanya "kapan lulus" terimakasih atas motivasinya
8. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, saya ucapkan banyak terimakasih

Semoga skripsi ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, Mei 2016

Penulis

RINGKASAN

Desy Arisandi. Skripsi mengenai Karakterisasi Fisikokimia Dan Bioavailabilitas Nanokalsium Hasil Ekstraksi Tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Menggunakan Larutan Asam (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Anies Chamidah, MP** dan **Dr. Ir. Hardoko, MS**).

Kalsium merupakan salah satu mineral esensial yang sangat dibutuhkan dalam berbagai fungsi tubuh. Konsumsi kalsium yang kurang akan menyebabkan tulang menjadi rapuh dan mudah patah. Kurangnya konsumsi kalsium ini disebabkan oleh kalsium yang umum dimasyarakat terdapat dalam ukuran mikro. Ukuran tersebut terkait dengan besarnya penyerapan kalsium oleh tubuh. Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil perlu dikembangkan untuk memperbesar penyerapan kalsium dalam tubuh. Teknologi untuk kalsium yang perlu dikembangkan adalah teknologi nano. Pada penelitian ini, sumber kalsium yang digunakan adalah tulang ikan bandeng. Pengolahan ikan bandeng setiap harinya menghasilkan limbah tulang yang relatif banyak dan belum dimanfaatkan secara maksimal. Salah satu upaya untuk mengurangi limbah tulang ikan bandeng adalah dengan mengekstrak kandungan kalsiumnya dalam bentuk nano.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan lama waktu perendaman optimum pada ekstraksi bubuk tulang ikan bandeng terhadap nanokalsium yang dihasilkan serta menentukan karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang meliputi preparasi bahan baku, ekstraksi nanokalsium dan analisis nanokalsium terhadap beberapa parameter uji yaitu fisikokimia yang meliputi rendemen, derajat putih, ukuran partikel, pH, kelarutan kalsium, kadar air, abu, lemak, protein, kadar kalsium, gugus fungsi serta analisis bioavailabilitas secara *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam memberikan pengaruh nyata terhadap karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium.

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu waktu perendaman optimum untuk menghasilkan nanokalsium selama 72 jam. Hasil analisis karakteristik fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng terbaik yaitu rendemen sebesar 6,96%, kadar air 4,08%, kadar lemak 1,42%, kadar protein 4,80%, kadar abu 89,91%, kadar kalsium 40,94%, derajat putih 61,00%, pH 6,16%, kelarutan kalsium 11,42%, distribusi ukuran partikel 50,75-396,1 nm, analisis spektra FTIR nanokalsium terbentuk gugus fosfat PO_4^{3-} , karbonat CO_3^{2-} dan hidroksil (OH^-) yang membentuk hidroksiapatit. Hidroksiapatit termasuk kedalam kelompok senyawa kalsium fosfat. Bioavailabilitas terbaik pada menit ke 30 yaitu 10,60%.

KATA PENGANTAR

Proposal skripsi yang berjudul “Karakterisasi Fisikokimia dan Bioavailabilitas Nanokalsium Hasil Ekstraksi Tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Menggunakan Larutan Asam” ini menyajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi proses pembuatan nanokalsium dari tulang ikan bandeng, mulai dari proses ekstraksi, pengecilan ukuran hingga proses pengujian yang meliputi duabelas parameter uji yaitu pengukuran rendemen, kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar protein, derajat keasaman, derajat putih, ukuran partikel, gugus fungsi, serta bioavailabilitas dari nanokalsium yang dihasilkan.

Penulis menyadari bahwa adanya kekurangan dalam penyusunan proposal ini, oleh karena itu penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Penulis juga berharap semoga proposal skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak untuk pengembangan wawasan dimasa yang akan datang. Amin

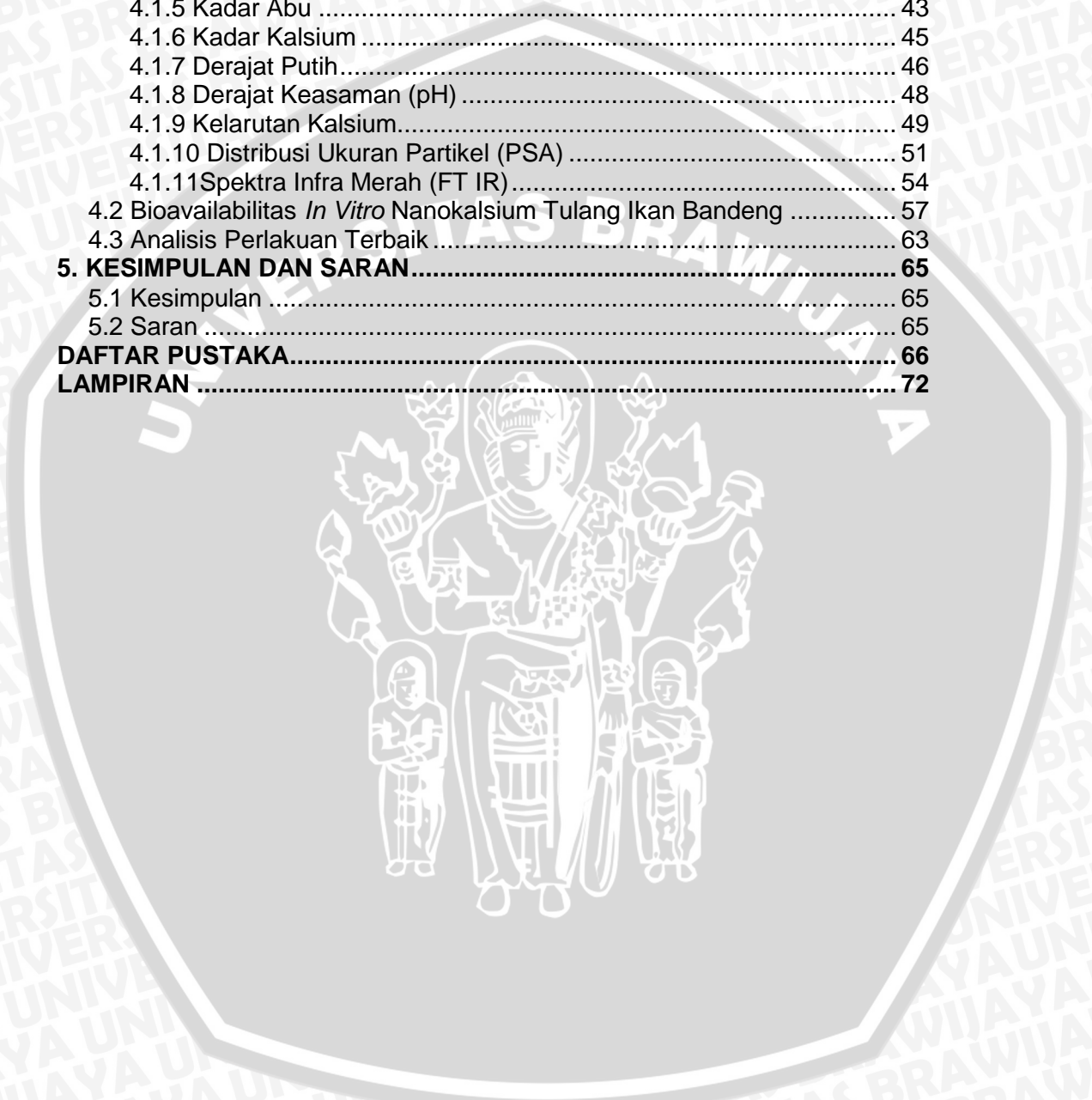
Malang, 20 Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan Penelitian	4
1.6 Waktu dan Tempat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ikan Bandeng (<i>Chanos chanos</i>).....	5
2.2 Limbah Pengolahan Ikan Bandeng	6
2.3 Tulang Ikan Bandeng.....	6
2.4 Kalsium.....	7
2.4.1 Kegunaan Kalsium Dalam Tubuh.....	8
2.4.2 Kebutuhan Kalsium.....	9
2.4.3 Penyerapan Kalsium.....	10
2.4.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyerapan Kalsium.....	11
2.5 Nanopartikel.....	14
2.5.1 Pembuatan Nanopartikel.....	14
2.5.2 Media Pembuatan Nanopartikel	16
2.6 Bioavailabilitas Nanokalsium.....	17
3. METODOLOGI	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	20
3.3 Metode Penelitian	21
3.3.1 Preparasi Bahan Baku	22
3.3.2 Ekstraksi Nanokalsium.....	23
3.4 Parameter Uji	26
3.4.1 Karakterisasi Fisikokimia	26
3.4.1.1 Pengukuran Rendemen	26
3.4.1.2 Penentuan Kadar Air	26
3.4.1.3 Penentuan Kadar Lemak.....	27
3.4.1.4 Penentuan Kadar Abu	27
3.4.1.5 Penentuan Kadar Protein	27
3.4.1.6 Penentuan Kadar Kalsium.....	28
3.4.1.7 Analisis Derajat Putih	29
3.4.1.8 Analisis Derajat Keasaman (pH)	29
3.4.1.9 Analisis Kelarutan Kalsium.....	30
3.4.1.10 Analisis Ukuran Partikel (PSA)	30
3.4.1.11 Analisis Gugus Fungsi (FTIR)	31
3.4.2 Analisis Bioavailabilitas <i>In Vitro</i>	32

3.5 Rancangan Percobaan dan Analisis Data	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Karakterisasi Fisikokimia Nanokalsium.....	36
4.1.1 Rendemen	36
4.1.2 Kadar Air	37
4.1.3 Kadar Lemak	39
4.1.4 Kadar Protein.....	41
4.1.5 Kadar Abu	43
4.1.6 Kadar Kalsium	45
4.1.7 Derajat Putih.....	46
4.1.8 Derajat Keasaman (pH)	48
4.1.9 Kelarutan Kalsium.....	49
4.1.10 Distribusi Ukuran Partikel (PSA)	51
4.1.11 Spektra Infra Merah (FT IR).....	54
4.2 Bioavailabilitas <i>In Vitro</i> Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng	57
4.3 Analisis Perlakuan Terbaik	63
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
5.1 Kesimpulan	65
5.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN	72



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Bandeng.....	5
2. Teknis Pembuatan Nanopartikel <i>top down</i> dan <i>bootom up</i>	15
3. Preparasi Bahan Baku Bubuk Tulang Ikan Bandeng.....	23
4. Diagram Alir Pembuatan Bubuk Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng.....	25
5. Instrumen Tabung Crane dan Wilson.....	34
6. Grafik Hubungan Rendemen dan Lama Waktu Perendaman.....	36
7. Grafik Hubungan Kadar Air dan Lama Waktu Perendaman	38
8. Grafik Hubungan Kadar Lemak dan Lama Waktu Perendaman.....	40
9. Grafik Hubungan Kadar Protein dan lama Waktu Perendaman	42
10. Grafik Hubungan Kadar Abu dan Lama Waktu Perendaman	43
11. Grafik Hubungan Kadar Kalsium dan Lama Waktu Perendaman.....	45
12. Grafik Hubungan Derajat Putih dan Lama Waktu Perendaman	47
13. Grafik Hubungan pH dan Lama Waktu Perendaman	48
14. Grafik Hubungan Kelarutan Kalsium dan Lama Waktu Perendaman	50
15. Spektra FTIR Nanokalsium	56
16. Grafik Hubungan Biiavailabilitas dan Lama Waktu Penyerapan.....	58
17. Grafik Regresi Kuadratik Bioavailabilitas Nanokalsium	60
18. Ukuran Partikel sebelum dan sesudah perlakuan	61



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar Angka Kecukupan Kalsium.....	9
2. Rancangan Penelitian.....	35
3. Distribusi Ukuran Partikel Sampel Kontrol.....	52
4. Distribusi Ukuran Partikel Nanokalsium	52
5. Hasil Spektra FTIR Bahan Kontrol dan Nanokalsium	55



LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Analisis Perhitungan Rendemen.....	72
2. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Air	72
3. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Lemak.....	73
4. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Abu	74
5. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Protein	74
6. Dokumentasi Pembuatan Bubuk Tulang Ikan Bandeng	76
7. Dokumentasi Ekstraksi Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng.....	77
8. Dokumentasi Pengujian Kadar Kalsium	78
9. Dokumentasi Pengujian Derajat Putih.....	78
10. Dokumentasi Pengujian Kelarutan Kalsium	78
11. Dokumentasi Analisis Ukuran Partikel	79
12. Dokumentasi Pengujian Bioavailabilitas.....	79
13. Data Rendemen Nanokalsium	81
14. Analisis Sidik Ragam Rendemen	81
15. Uji Lanjut BNT Rendemen	81
16. Data Kadar Air Nanokalsium.....	81
17. Analisis Sidik Ragam Kadar Air	82
18. Data Kadar Lemak Nanokalsium.....	82
19. Analisis Sidik Ragam Lemak.....	82
20. Uji Lanjut BNT Lemak	82
21. Data Kadar Protein Nanokalsium	83
22. Analisis Sidik Ragam Protein	83
23. Uji Lanjut BNT Protein	83
24. Data Kadar Abu Nanokalsium.....	83
25. Analisis Sidik Ragam Kadar Abu.....	84
26. Uji Lanjut BNT Kadar Abu.....	84
27. Data Larutan Standar Kalsium dan Absorbansinya.....	84
28. Kurva Kalibrasi Kalsium	84
29. Data Kadar Kalsium Nanokalsium.....	85
30. Analisis Sidik Ragam Kalsium.....	85
31. Uji Lanjut BNT Kalsium	85
32. Data Derajat Putih Nanokalsium	85
33. Analisis Sidik Ragam Derajat Putih.....	86
34. Uji Lanjut BNT Derajat Putih	86
35. Data Derajat Keasaman (pH) Nanokalsium	86
36. Analisis Sidik Ragam pH.....	86
37. Uji Lanju BNT pH	87
38. Data Kelarutan Nanokalsium	87
39. Analisis Sidik Ragam Kelarutan	87
40. Uji Lanjut BNT Kelarutan	87
41. Data Distribusi Ukuran Partikel Sampel Sebelum Perlakuan (P0).....	88
42. Data Distribusi Ukuran Partikel Sampel Perendaman 24 jam.....	88
43. Data Distribusi Ukuran Partikel Sampel Perendaman 48 jam.....	88
44. Data Distribusi Ukuran Partikel Sampel Perendaman 72 jam.....	89
45. Data Bioavailabilitas Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng.....	89
46. Analisis Sidik Ragam Bioavailabilitas	90
47. Uji Lanju BNT Bioavailabilitas Nanokalsium.....	90
48. Hasil Ranking Parameter	90
49. Bobot Parameter.....	91
50. Indeks Efektivitas de Garmo	91

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kalsium merupakan salah satu mineral esensial yang sangat dibutuhkan dalam berbagai fungsi tubuh. Salah satu fungsi kalsium yaitu sebagai komponen utama pembentuk tulang dan gigi. Sekitar 99% kalsium dalam tubuh ditemukan pada tulang dan gigi serta sekitar 1% terdapat pada cairan ekstra sel (Nabil, 2005).

Konsumsi kalsium yang kurang akan menyebabkan tulang menjadi rapuh dan mudah patah atau disebut dengan osteoporosis. Selain itu kekurangan kalsium pada masa pertumbuhan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan tulang, dan osteomalasia (Nieves, 2005). Permasalahan kekurangan kalsium dalam tubuh ini disebabkan oleh kalsium yang umum dimasyarakat baik kalsium nabati maupun hewani masih belum terabsorpsi secara optimal oleh tubuh, akibatnya dapat menimbulkan defisiensi kalsium (Tongchan *et al.*, 2009). Penyerapan kalsium ini berhubungan dengan bioavailabilitas kalsium yang dipengaruhi oleh faktor lain salah satunya adalah ukuran partikel kalsium.

Bioavailabilitas mineral digunakan untuk menjelaskan proses fisikokimia dan fisiologis yang mempengaruhi penyerapan fraksional mineral dalam tubuh sehingga mineral tersebut dapat digunakan oleh tubuh untuk menjalankan fungsi metabolisme (Odell, 1997)

Kalsium yang umumnya dikonsumsi terdapat dalam ukuran mikro, ukuran ini hanya dapat terabsorpsi sekitar 50% karena reseptor sulit masuk kedalam tubuh sehingga sering menyebabkan defisiensi. Ukuran partikel kalsium terkait dengan besarnya penyerapan kalsium oleh tubuh, sehingga diperlukan teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil untuk memperbesar penyerapan kalsium dalam tubuh. Menurut Suptijah(2009), teknologi pembentukan ukuran

kalsium yang perlu dikembangkan adalah teknologi nano. Teknologi nano dapat menciptakan suatu kalsium dengan ukuran yang sangat kecil yaitu 1-1000nm (10^{-9} m).

Nanokalsium merupakan kalsium dalam ukuran yang sangat kecil (nanometer) sehingga dapat terserap oleh tubuh dengan sempurna. Ukuran yang sangat kecil ini menyebabkan kalsium mudah memasuki reseptor dan dapat terabsorpsi secara optimal ke dalam tubuh. Nanokalsium dapat terabsorpsi oleh tubuh hampir 100% (Park *et al.*, 2007). Hal ini lebih efisien dibandingkan dengan kalsium ukuran mikro yang biasa dikonsumsi masyarakat. Sehingga dibutuhkan sumber kalsium yang *bioavailable* bagi tubuh.

Tulang ikan merupakan komponen yang terdiri dari 10-15% dari total biomassa ikan yang termasuk sumber mineral penting terutama kalsium. Tulang ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber kalsium alami yang berpotensi untuk bahan fortifikan pada produk pangan. Menurut Orias (2008), kandungan kalsium pada tulang ikan membentuk kompleks dengan fosfor dalam bentuk apatit atau trikalsiumfosfat yang menyebabkan bubuk kalsium tulang ikan mudah diserap oleh tubuh.

Tulang Ikan bandeng (*Chanos-chanos*) merupakan tulang keras yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber kalsium. Pengolahan ikan bandeng setiap harinya menghasilkan limbah tulang yang relatif banyak, di daerah Gresik, Jawa Timur. Limbah tulang ikan bandeng dapat mencapai lebih dari 15 kg/hari (Fatimah, 2008). Limbah tulang ini biasanya dibuang dan belum dimanfaatkan secara maksimal, padahal tulang ikan merupakan salah satu sumber kalsium. Untuk memanfaatkan limbah tulang ikan bandeng maka diperlukan teknologi yang dapat mengubah tulang ikan bandeng menjadi bubuk kalsium. Teknologi nano dapat mengubah tulang ikan bandeng menjadi kalsium berukuran kecil (nano).

Ekstraksi tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam dapat meningkatkan kadar kalsium karena memudahkan pelarut masuk kedalam matriks sehingga pelepasan kalsium lebih mudah (Suptijah *et al.*, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan tulang ikan bandeng menjadi nanokalsium. Serta untuk menentukan karakteristik fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Berapa lama waktu perendaman yang optimum didalam larutan asam pada ekstraksi bubuk tulang ikan bandeng untuk menghasilkan nanokalsium?
2. Bagaimana karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu tujuan umum dan tujuan khusus. Adapun tujuan umum pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam, sedangkan tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk menentukan lama waktuperendaman optimum pada ekstraksi bubuk tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam terhadap nanokalsium yang dihasilkan.
2. Untuk menentukan karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Semakin lama waktu perendaman bubuk tulang ikan bandeng (*Chanos chanos*) menggunakan larutan asam akan menghasilkan nanokalsium yang semakin tinggi.
2. Nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan bandeng (*Chanos chanos*) menggunakan larutan asam memberikan pengaruh nyata terhadap karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memanfaatkan limbah tulang ikan bandeng sebagai bahan baku pembuatan nanokalsium yang keberadaannya diharapkan dapat dijadikan sebagai sumber kalsium yang dapat diserap tubuh secara optimum.

1.6 Waktu dan Tempat Penelitian

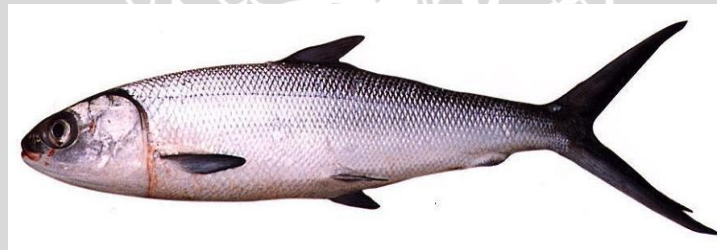
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan April-Oktober 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)

Ikan bandeng termasuk dalam kelompok ikan herbivora. Kelompok ini memakan makanan alami yang terdiri dari fitoplankton dan lumut. Klasifikasi ikan bandeng menurut Saanin (1984) adalah:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Pisces
Sub class	: Teleostei
Ordo	: Malacopterygii
Family	: Chanidae
Genus	: Chanos
Species	: <i>Chanos chanos</i> (Forsk)



Gambar 1. Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)

Ikan bandeng merupakan jenis ikan yang paling banyak dibudidayakan di tambak dan salah satu komoditas perikanan yang memiliki rasa cukup enak serta gurih sehingga banyak digemari masyarakat. Disisi lain terdapat kelemahan dari ikan bandeng, yaitu banyaknya duri halus didalam daging ikan yang cukup mengganggu konsumen dalam mengkonsumsi dagingnya. Dalam rangka meminimalisir kelemahan ikan bandeng maka dilakukan proses pencabutan duri

(Vatria, 2010). Dengan kondisi demikian akan memudahkan konsumen dalam mengonsumsi ikan bandeng. Produk ini kemudian disebut sebagai bandeng cabut duri.

2.2 Limbah Pengolahan Ikan Bandeng

Limbah industri perikanan dapat didefinisikan sebagai apa saja yang tersisakan terbuang dari suatu kegiatan serta pengolahan hasil perikanan (Anugrah, 2010). Limbah industri perikanan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku berbagai macam produk olahan yang bermanfaat bagi kebutuhan manusia.

Limbah pengolahan ikan bandeng umumnya dihasilkan pada proses pengolahan tradisional ikan bandeng seperti bandeng cabut duri dan otak-otak bandeng. Pengolahan ikan di daerah Jawa Timur khususnya di daerah pesisir seperti Gresik, setiap harinya menghasilkan limbah tulang yang relatif banyak. Sebagai contoh di perusahaan otak-otak bandeng Bu Muzana perharinya dapat mengolah hingga 2 kwintal ikan bandeng, sedangkan limbah tulang yang dihasilkan dapat mencapai ± 15 kg (Fatimah, 2008). Padahal pengolahan semacam itu banyak sekali di Kabupaten Gresik sehingga limbah yang dihasilkan juga semakin besar jumlahnya.

2.3 Tulang Ikan Bandeng

Tulang ikan merupakan komponen utama yang terdiri dari 10-15% total biomassa ikan yang mengandung sumber mineral penting seperti kalsium (Hemung, 2013). Produksi pengolahan ikan umumnya menghasilkan limbah tulang ikan dengan kandungan mineral 60-70% dalam bentuk anorganik terutama kalsium fosfat, keratin fosfat dan hidroksiapatit (Lekahena *et al.*, 2014).

Tulang ikanbandeng merupakan limbah yang diperoleh dari hasil pengolahan bandeng cabut duri. Tulang ini biasanya dimanfaatkan sebagai tepung untuk pakan ikan maupun pakan ternak. Di Jepang pemanfaatan tulang ikan dilakukan untuk memproduksi kalsium dalam bentuk tepung tulang yang dapat dikonsumsi manusia (Nabil, 2005).

Tulang ikan bandeng ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber kalsium untuk keperluan pengayaan (*enrichment*) serta sebagai upaya fortifikasi zat gizi dalam makanan. Pemanfaatan limbah tulang ikan bandeng ini ditujukan untuk mendapatkan hasil guna dan daya guna sebesar mungkin tanpa mengganggu kelestarian lingkungan.

2.4 Kalsium

Kalsium merupakan makromineral yang paling banyak terdapat di semua jaringan tubuh yang terlibat dalam proses biologi dan metabolisme tubuh (Suarsana *et al.*, 2011). Sekitar 99% kalsium dalam tubuh ditemukan pada tulang dan gigi serta 1% terdapat pada cairan ekstra sel (Nabil, 2005).

Kalsium tulang ikan membentuk kompleks dengan fosfor dalam bentuk apatit atau trikalsiumfosfat, merupakan mineral yang dibutuhkan oleh tubuh sebagai komponen metabolisme pada berbagai proses biokimia, fisiologis dan pemeliharaan jaringan tulang (Sittikulwitit *et al.*, 2004). Kandungan kalsium dan fosfor yang tinggi pada tulang ikan dapat dimanfaatkan sebagai sumber kalsium alami untuk memenuhi asupan kalsium harian (Lekahena *et al.*, 2014).

Kalsium pada tulang sebelum difortifikasikan dalam makanan harus diubah menjadi bentuk yang dapat dicerna dan diserap tubuh dengan sempurna. Proses ekstraksi menggunakan larutan asam dan basa pada suhu yang tinggi dapat merubah dan melunakkan struktur matriks tulang. Kalsium umumnya tersedia dalam ukuran mikro (μ), yang diduga dalam proses metabolisme tubuh

hanya terserap 50% dari total kalsium yang dikonsumsi. Salah satu alternatif untuk meningkatkan penyerapan kalsium secara maksimal dengan membentuk nano kalsium (Suptijah, 2009).

Nanokalsium adalah kalsium yang dihasilkan dengan memanfaatkan teknologi nano sehingga membentuk kalsium dengan ukuran yang sangat kecil (nanometer). Ukuran yang sangat kecil ini memudahkan dalam memasuki sel tubuh karena mudah memasuki reseptor sehingga dapat terabsorpsi secara cepat dan sempurna ke dalam tubuh (Park *et al.*, 2007). Sedangkan Gao *et al.* (2007), menyatakan bahwa tikus yang diberi nanokalsium memiliki buangan kalsium yang rendah pada feses dan urin dibandingkan tikus yang diberi pakan mikrokalsium.

2.4.1 Kegunaan Kalsium dalam Tubuh

Kalsium dalam tubuh memegang peranan yang sangat penting. Menurut Muchtadi *et al.* (1993), kegunaan kalsium dalam tubuh diantaranya, yaitu :

- a. Sebagai komponen utama pembentuk tulang dan gigi serta memelihara ketegaran kerangka tubuh;
- b. Mengatur proses pembekuan darah;
- c. Sebagai *intracelular regulator* atau *messenger*, yaitu membantu regulasi aktivitas otot-otot kerangka, jantung dan jaringan lain;
- d. Sebagai bagian dari enzim, yaitu lipase, suksinat dehidrogenase, adenosine trifosfatase dan beberapa enzim proteolitik tertentu;
- e. Kontraksi dan relaksasi otot. Tanpa kalsium semua otot akan kehilangan kemampuannya untuk berkontraksi;
- f. Mengirimkan isyarat ke jaringan-jaringan tubuh;
- g. Penyimpanan dan pelepasan neurotransmitter;
- h. Penyimpanan dan pelepasan hormon;
- i. Pengaturan sekresi gastrin dan menjaga keseimbangan osmotik.

Kalsium juga berfungsi sebagai katalisator berbagai reaksi biologis, seperti absorpsi vitamin B₁₂, tindakan enzim pemecah lemak, lipase pankreas, ekskresi insulin oleh pankreas, pembentukan dan pemecahan asetilkolin, yaitu bahan yang diperlukan dalam transmisi suatu rangsangan dari serabut syaraf yang satu ke yang lainnya. Kalsium yang diperlukan untuk mengkatalisis reaksi-reaksi ini diambil dari persediaan kalsium dalam tubuh (Almatsier, 2002).

2.4.2 Kebutuhan Kalsium

Kebutuhan kalsium dalam tubuh manusia berbeda menurut usia dan jenis kelaminnya. Status kalsium ditentukan oleh kombinasi faktor usia, jenis kelamin dan faktor hormonal. Interaksi kompleks dari faktor tersebut menentukan jumlah kalsium tersedia (*available*) yang dapat diserap, kapasitas intestin untuk menyerap, dan jumlah kalsium yang hilang dalam urin, kelenjar keringat maupun feses (Percival, 1999). Tabel 1 menunjukkan kebutuhan kalsium per hari yang terekomendasi dalam Rifai *et al.*, (2004).

Tabel 1. Daftar Angka Kecukupan Kalsium

Kelompok Umur	(Kebutuhan Ca (mg/hari))
Bayi (bulan)	
0-6	200
7-11	400
Anak (tahun)	
1-6	500
7-9	600
Pria (tahun)	
10-18	1000
19-49	800
50-64	1000
>65	1000
Wanita (tahun)	
10-18	1000
19-49	800
50-64	1000
>65	1000
Hamil	+150
Menyusui (bulan)	
0-6	+150
7-12	+150

Sumber: Rifai *et al.*, (2004)

Kebutuhan tubuh akan kalsium dapat dipenuhi dengan mengonsumsi makanan sumber kalsium. Makanan sumber kalsium terbagi menjadi dua yaitu hewani dan nabati. Sumber kalsium hewani diantaranya adalah ikan, udang, susu, kuning telur, dan daging sapi. Sumber kalsium nabati dapat diperoleh dari sayuran daun hijau, kacang – kacangan serta hasil olahannya, dan biji-bijian seperti jagung. Akan tetapi konsumsi berlebihan Ca dari sumber hewani maupun nabati dapat menghambat penyerapan kalsium, dan akan meningkatkan keasaman (pH) darah karena kandungan proteinnya yang tinggi, untuk menjaga keasaman darah agar tetap normal, tubuh menarik deposit kalsium yang bersifat basa dari tulang, sehingga kepadatan tulang berkurang.

2.4.3 Penyerapan Kalsium

Kalsium diabsorpsi ke dalam tubuh melewati usus halus melalui dua mekanisme, yaitu transeluler dan paraseluler. Mekanisme transeluler melibatkan transpor aktif kalsium, sedangkan mekanisme paraseluler melibatkan transpor kalsium secara pasif. Absorpsi kalsium tinggi apabila kebutuhan kalsium juga tinggi (Bronner, 2008).

Pada keadaan normal sebanyak 30-50 % kalsium yang dikonsumsi diabsorpsi tubuh. Kemampuan absorpsi lebih tinggi pada masa pertumbuhan, dan menurun pada proses menua. Kemampuan absorpsi pada laki – laki lebih tinggi daripada perempuan pada semua golongan usia. Absorpsi kalsium terutama terjadi di bagian atas usus halus yaitu *duodenum*. Kalsium membutuhkan pH 6 agar dapat berada dalam keadaan terlarut. Absorpsi kalsium terutama dilakukan secara aktif dengan menggunakan alat angkut protein-pengikat kalsium. Absorpsi pasif terjadi pada permukaan saluran cerna. Kalsium yang tidak diabsorpsi dikeluarkan melalui feses. Jumlah kalsium yang diekskresi melalui urin mencerminkan jumlah kalsium yang tidak diabsorpsi oleh tubuh (Kurniawati, 2014).

Absorpsi kalsium dari saluran pencernaan akan efisien bila kalsium dalam bentuk yang terlarut, umumnya dalam bentuk ion kalsium. Salah satu faktor pendorong dari daya larut mineral yang dapat memecah dan mereduksi molekul-molekul mineral menjadi bentuk yang mudah diserap oleh tubuh adalah kondisi pH asam (Sediaoetama, 2000). Kondisi asam menyebabkan kalsium yang semula berikatan dengan komponen lain berubah menjadi bentuk sederhana (ion) sehingga akan meningkatkan kelarutannya, dalam hal ini asam lambung bertindak sebagai *enhancer* yaitu molekul atau senyawa yang mempengaruhi kalsium sehingga bersifat larut dan selanjutnya dapat diabsorpsi oleh mukosa sel usus (Suzuki *et al.*, 1992).

2.4.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyerapan Kalsium

Kalsium yang dikonsumsi manusia tidak terabsorpsi oleh tubuh secara keseluruhan. Proses absorpsi kalsium dalam tubuh ini dipengaruhi oleh beberapa faktor penting yang dapat mendorong dan menghambat absorpsi kalsium dalam tubuh. Almatsier(2002), menyatakan bahwa vitamin D, protein, fosfor, asam oksalat dan asam fitat, serat makanan serta nilai pH dan kelarutannya merupakan beberapa faktor yang mempengaruhi absorpsi kalsium dalam tubuh.

a. Vitamin D

Proses penyerapan kalsium dalam tubuh dipengaruhi oleh vitamin D. Kalsium diabsorpsi dari usus secara transpor aktif, yaitu melalui perbedaan konsentrasi dengan suatu proses yang membutuhkan energi. Vitamin D dalam bentuk $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ dibutuhkan untuk transpor aktif kalsium. Protein pengikat kalsium diinduksi oleh vitamin D, demikian juga ATPase yang diaktifkan oleh kalsium, terlibat dalam modulasi vitamin D terhadap absorpsi kalsium. Beberapa faktor dalam makanan dapat menurunkan atau meningkatkan absorpsi kalsium di

dalam usus. Vitamin D merupakan salah satu faktor dalam makanan yang meningkatkan absorpsi kalsium (McDowell, 1992).

b. Protein

Protein berperan penting dalam penyerapan kalsium ke dalam mukosa usus. Transportasi kalsium melalui sel usus dapat terjadi melalui difusi menggunakan jasa protein pengikat kalsium yang menghantarkan kalsium sitoplasma eritrosit ke membran basal. Kekurangan protein menyebabkan gangguan pada absorpsi dan transportasi zat-zat gizi (Almatsier 2002). Protein yang mendorong penyerapan kalsium berupa asam amino yaitu lisin dan arginin (Harland and Oberleas 2001).

c. Fosfor

Kalsium dan fosfor saling berpengaruh erat dalam proses absorpsi kalsium. Menurut Sediaoetama (2000) untuk absorpsi kalsium yang baik diperlukan perbandingan Ca:P dalam rongga usus 1:1 sampai 1:3. Perbandingan Ca:P yang lebih besar dari 1:3 akan menghambat penyerapan Ca, sehingga dapat menimbulkan penyakit defisiensi Ca, yaitu rakhitis. Umumnya rasio Ca:P dalam makanan antara 1:1 dan 1:2. Konsumsi fosfor yang tinggi akan menyebabkan meningkatnya ekskresi kalsium dalam feses dan menurunkan ekskresi kalsium dalam urin, namun tidak mempengaruhi keseimbangan kalsium tubuh. Perbandingan kalsium dan fosfor yang optimal masih belum jelas dan kontroversial.

d. Asam Oksalat dan Asam Fitat

Bahan makanan yang mengandung banyak asam oksalat dan asam fitat, dapat menurunkan absorpsi kalsium. Kandungan asam fitat banyak terdapat dalam tumbuhan, sel mikroorganisme, ternak serta bahan makanan yang mengandung biji-bijian. Adanya zat organik seperti asam oksalat dan asam fitat dalam bahan dapat bergabung dengan kalsium membentuk garam yang tidak

larut. Asam oksalat dan kalsium membentuk garam yang tidak larut berupa kalsium oksalat sehingga mengendap di dalam rongga usus dan tidak dapat diserap ke dalam mukosa (Sediaoetama, 2000).

e. Serat Makanan

Serat makanan merupakan komponen tanaman yang tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan manusia, contohnya komponen dinding sel tumbuhan (selulosa, hemiselulosa, pektin dan lignin) dan polisakarida intraseluler seperti gum. Harland and Oberleas (2001) menyatakan bahwa serat bersama-sama dengan fitat dan oksalat mengurangi penyerapan kalsium.

Berdasarkan jenis kelarutannya, serat dibagi menjadi 2 yaitu serat larut air dan serat tidak larut air. Serat larut dapat mengikat air dan menciptakan larutan yang viscus dalam saluran pencernaan sehingga menyebabkan perlambatan pengosongan perut dari makanan dan menghalangi percampuran makanan dengan enzim, mengurangi tingkat difusi nutrisi sehingga melalui mekanisme ini kalsium sulit terserap oleh mukosa usus (Groff and Gropper, 1990).

Serat tidak larut air menghalangi lebih banyak kalsium dari pada serat larut air, karena menurunkan waktu transit bahan pangan selama di usus halus sehingga mengurangi waktu penyerapan kalsium. Selanjutnya, serat tidak larut akan secara otomatis mengurangi kesempatan kerja enzim (Groff and Gropper, 1990).

f. Nilai pH dan Kelarutannya

Kalsium membutuhkan pH 6 agar berada dalam keadaan terlarut. Kelarutan merupakan salah satu syarat dalam penyerapan kalsium. Kalsium hanya dapat diabsorpsi bila dalam bentuk larut air dan tidak mengendap karena unsur makanan lain seperti oksalat (Almatsier, 2002). Menurut Allen and Wood (1994) kelarutan kalsium meningkat dalam lingkungan asam pada perut, tetapi

ion terlarut akan bergabung kembali kemudian berpresipitasi dalam jejunum dan ileum, dimana pH-nya mendekati netral. Menurut Anggorodi (1995), pH kandungan usus juga berpengaruh terhadap proses absorpsi kalsium dalam tubuh.

2.5 Nanopartikel

Nanopartikel secara umum didefinisikan sebagai partikel yang berukuran 1-100 nanometer (Ramsden, 2009). Berdasarkan standart pengukuran internasional, maka 1 nm sama dengan ($1/1.000.000.000$) m atau 10^{-9} m, hal ini berarti partikel dengan ukuran kurang dari 1000 nm dianggap sebagai nanopartikel. Sehingga nanopartikel adalah partikel berukuran antara 1-1000 nm (Poole and Owens, 2003).

Tujuan pembuatan nanopartikel antara lain meningkatkan stabilitas senyawa aktif terhadap degradasi lingkungan (oksidasi, hidrolisis, penguraian enzimatis), memperbaiki sistem penghantaran obat, memperbaiki absorpsi senyawa, mempermudah penanganan bahan toksik, menutupi rasa dan bau yang kurang sedap suatu zat aktif, mengurangi efek iritasi zat aktif terhadap saluran cerna, memodifikasi pelepasan zat aktif dan meningkatkan kelarutan dalam air (Lanimarta, 2012).

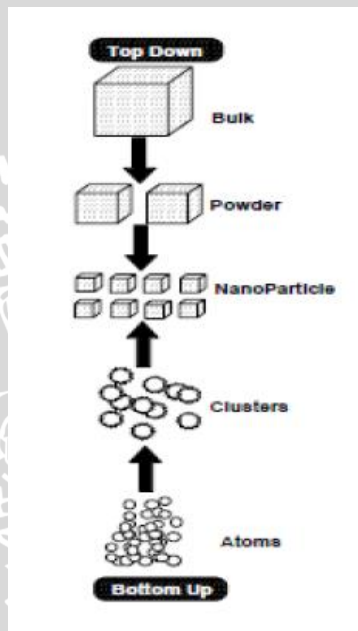
Nanopartikel memiliki banyak aplikasi potensial dalam bidang energi, kesehatan, elektronik, lingkungan, pangan dan industri. Aplikasi nanoteknologi di sektor pangan meliputi peningkatan rasa, warna, flavor, tekstur dan konsistensi produk makanan, meningkatkan penyerapan serta bioavailabilitas nutrisi dan senyawa bioaktif (Greiner, 2009).

2.5.1 Pembuatan Nanopartikel

Pembuatan nanopartikel secara umum dibedakan menjadi dua proses yaitu *top down* dan *bottom up*. *Top down* merupakan pembuatan struktur nano

dengan memperkecil material yang besar. Pada proses ini diberikan tekanan yang akan menghasilkan pemecahan partikel, sedangkan *bottom-up* merupakan cara merangkai atom atau molekul dan menggabungkannya melalui reaksi kimia untuk membentuk nano struktur (Greiner, 2009).

Metode yang digunakan pada proses *top-down* antara lain, *pearl/ball milling*, *high-pressure homogenization*, *lithography/etching*, sedangkan metode *bottom up* yaitu menggunakan teknik sol-gel, presipitasi kimia, dan aglomerasi fasa gas (Dutta and Hofmann 2005). Pembuatan nanopartikel dengan metode *top down* dan *bottom up* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Teknis pembuatan nanopartikel *top-down* dan *bottom-up*

Metode presipitasi merupakan teknik pendekatan *bottom up*. Proses presipitasi kimia dilakukan dengan cara melarutkan zat aktif ke dalam pelarut, hal ini menyebabkan larutan menjadi jenuh dan terjadi nukleasi yang cepat sehingga membentuk nanopartikel (Kenth, 2009). Pada proses ini mencampur ion-ion dalam jumlah tertentu dan mengontrol suhu serta tekanan untuk membentuk *insoluble* material yang akan membentuk endapan. Endapan dikumpulkan dengan cara penyaringan atau *spray drying* untuk mendapatkan butiran kering.

Menurut Haskell (2005), metode presipitasi dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan di dalam larutan melalui perubahan pH, suhu, atau pelarut. Endapan yang dihasilkan dari kondisi yang sangat jenuh memiliki banyak partikel berukuran kecil. Kelebihan metode ini adalah dapat menghasilkan partikel lebih kecil dari 100 nm, sederhana dan biaya rendah, sedangkan kelemahannya yaitu nanopartikel yang terbentuk harus distabilisasi untuk mencegah timbulnya kristal berukuran mikro (Kent, 2009).

2.5.2 Media Pembuatan Nanopartikel

Pemilihan media yang akan digunakan dalam proses pembuatan partikel berukuran nano perlu diperhatikan juga. Pemilihan media ini menentukan apakah partikel tersebut dapat diubah dalam bentuk nano. Pada umumnya media yang digunakan untuk pembuatan partikel ukuran nano adalah dengan menggunakan media cair yang dapat membentuk suspensi dan tidak terjadi penggumpalan (Gedanken, 2004).

Pembuatan nanokalsium dengan metode presipitasi kimia dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan di dalam larutan melalui perubahan pH yaitu menggunakan media larutan asam atau basa (Suptijah *et al.*, 2012). Penggunaan larutan asam merupakan salah satu media yang sering digunakan untuk pembuatan partikel ukuran nano. Penggunaan larutan asam seperti HCl, antara lain digunakan dalam pembuatan nanokalsium dari cangkang udang Vanamei yang mampu menghasilkan ukuran partikel 37-127 nm (Suptijah *et al.*, 2012). Penggunaan HCl juga digunakan untuk pembuatan nanokalsium dari tulang ikan Nila yang menghasilkan ukuran partikel 242,35 nm, sedangkan penggunaan larutan basa seperti NaOH digunakan dalam pembuatan nanokalsium dari tulang ikan Nila yang mampu menghasilkan ukuran partikel 235,93 nm (Lekahena *et al.*, 2014).

Ekstraksi nanokalsium dengan metode presipitasi menggunakan media larutan HCl dapat meningkatkan kadar kalsium. Perendaman sampel menggunakan HCl dapat meningkatkan kadar kalsium sebesar 85,49% karena memudahkan pelarut masuk ke dalam matriks sehingga pelepasan kalsium lebih mudah (Suptijah *et al.*, 2012). Hal ini didukung oleh hasil penelitian Lekahena *et al.* (2014), yaitu ekstraksi menggunakan asam (HCl) menghasilkan kadar kalsium lebih besar dibandingkan ekstraksi basa (NaOH). Kadar kalsium yang dihasilkan dari ekstraksi asam (HCl) sebesar 21,48%. Sehingga pada penelitian ini media yang digunakan untuk membuat nanopartikel yaitu menggunakan larutan asam (HCl).

Pemilihan penggunaan media pelarut seperti larutan asam, basa dan media pelarut yang lain dilakukan pada umumnya berdasarkan pertimbangan bahan mudah diperoleh, proses pemisahan lebih mudah dan menghasilkan kadar kalsium yang lebih besar.

2.6 Bioavailabilitas Nanokalsium

Bioavailabilitas adalah jumlah atau proporsi zat gizi dari makanan yang dapat diabsorpsi oleh tubuh dan digunakan untuk menjalankan fungsi metabolisme dalam tubuh pada kondisi normal. Bioavailabilitas kalsium digunakan untuk menjelaskan proses fisikokimia dan fisiologis yang mempengaruhi penyerapan fraksional kalsium dalam tubuh sehingga kalsium tersebut dapat digunakan oleh tubuh untuk menjalankan fungsi metabolisme (Nabil, 2005).

Bioavailabilitas kalsium pada prinsipnya dapat diukur dengan menggunakan metode *in vivo* dan *in vitro*. Secara *in-vivo*, pengujian bioavailabilitas mineral kalsium dapat dilakukan dengan mengukur konsentrasi kalsium dalam serum darah, urin, serta feses manusia. Selain manusia, metode

in vivo juga dapat digunakan pada hewan percobaan seperti tikus, marmut, babi dan monyet (Palupiet *et al.*, 2007). Adapun kelebihan dari pengujian bioavailabilitas mineral secara *in vivo* adalah situasi yang sesuai dengan fakta dan hasilnya lebih akurat, sedangkan kelemahan metode *in vivo* adalah membutuhkan waktu yang lama, mahal, metodenya rumit serta faktor fisiologis individu sangat mempengaruhi proses penyerapan atau absorpsi zat gizi.

Metode lain untuk mengukur bioavailabilitas kalsium adalah metode *in vitro*. Pada metode *in vitro* faktor fisiologis individu diasumsikan sama yaitu mengkondisikan proses seperti keadaan pencernaan sebenarnya yang terjadi di dalam tubuh. Adapun kelebihan dari pengujian bioavailabilitas mineral secara *in vitro* adalah cepat, metodenya mudah, dan biayanya relatif murah, sedangkan kelemahan metode *in vitro* ini adalah situasi yang digunakan tidak nyata, hanya mencontoh pada proses pencernaan serta hasil percobaannya kurang memberikan informasi mengenai keadaan tubuh (Judprasong *et al.*, 2007). Tetapi karena dalam penelitian ini hanya untuk mengetahui persen bioavailabilitas nanokalsium berdasarkan absorpsi atau penyerapannya maka kelemahan ini dapat diabaikan.

Analisis bioavailabilitas kalsium secara *in vitro* didasarkan atas prinsip bahwa kalsium yang telah dicerna dalam sistem pencernaan akan diserap melintasi dinding usus yang disimulasikan dengan kantong usus terbalik (*everted small intestinal sac technique*) yaitu menggunakan potongan usus halus tikus yang dibalik sehingga *villi* berada dibagian luar. Pembalikan ini dimaksudkan untuk mencukupi kebutuhan oksigen bagi sel-sel mukosa. Tujuan dari peletakan mukosa usus berada diluar untuk pengondisian seperti dalam tubuh manusia, dimana mukosa usus adalah bagian yang lipofil, sehingga diharapkan nantinya akan dapat diukur seberapa besar kadar nanokalsium yang dapat diabsorpsi oleh mukosa usus.

Pada penelitian ini hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan jenis *Ratus norvegicus*. Tikus putih biasa digunakan dalam percobaan laboratorium karena mudah dikembangbiakkan dan mudah dalam perawatannya, hewan ini juga memiliki struktur anatomi fisiologi yang hampir sama dengan manusia. Sehingga hasil uji yang dicobakan pada usus tikus putih dapat diaplikasikan pada manusia.

Ada dua hal yang dicontoh dalam kondisi *gastrointestinal* pada proses pencernaan, yaitu pada fase *gastric* (lambung), dan fase *intestinal* (usus halus). Simulasi kondisi sistem pencernaan pada fase lambung (*gatric*) yaitu dengan mengatur kondisinya menjadi pH 1,2 seperti kondisi pH yang terdapat di lambung. Simulasi kondisi sistem pencernaan pada fase *intestinal* (usus halus) yaitu dengan mengatur kondisinya menjadi pH 1-3 selama 30 menit yang bertujuan untuk simulasi netralisasi fase lambung, kemudian mengatur pHnya menjadi 7,4 selama 2 jam seperti yang terjadi pada usus halus (Puspita, 2003). Berdasarkan hal diatas, maka dapat dianalisis ketersediaan kalsium berdasarkan persentase absorpsinya.

3. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2015. Proses ekstraksi dan analisis dilakukan di beberapa laboratorium. Preparasi bahan baku dilakukan di Laboratorium Mekatronika Karang Ploso Malang. Ekstraksi nanokalsium, uji proksimat, derajat putih, uji kelarutan, derajat keasaman (pH), uji kadar kalsium dengan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) serta uji bioavailabilitas nanokalsium dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Analisis gugus fungsi menggunakan *Spektra Fourier Transform Infrared* (FTIR) dilakukan di Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang. Analisis ukuran partikel nanokalsium menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dilakukan di Laboratorium Fisika Zat Padat, Jurusan Fisika, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh November (ITS) Surabaya.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah tulang ikan bandeng yang didapatkan dari UKM Tani Bina Sejahtera, Gresik, Jawa Timur. Limbah tersebut berupa tulang belakang ikan tanpa kepala, sirip dan ekor. Panjang tulang ikan berkisar 20-25 cm dengan lebar 2-3 cm. Dalam penelitian ini, berat total tulang ikan yang digunakan sebanyak 10 kg.

Bahan lain yang digunakan adalah HCl 1 N dengan grade p.a, kertas saring Whatman, bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis proksimat, analisa kalsium (HNO_3 10 %, HCl 37 %, dan CaCO_3), bioavailabilitas secara *in vitro* dengan kantung usus tikus terbalik diantaranya HCl, air bebas ion (*deionized water*), cairan lambung (pepsin HCl) dan larutan NaCl fisiologis 0,9% b/v.

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas untuk ekstraksi dan analisis pengujian, timbangan analitik, ayakan 100 *mesh* dan 200 *mesh*, pengaduk, erlenmeyer 250 ml, *waterbath Memmert* tipe W 350/Jerman, botol gelas, *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) tipe AA 6300 Shimadzu, *Particle Size Analyzer* (Malvern Zetasizer Nanoseries Nano ZS ver 6.20, Malvern Instrments), *Fourier Transform infra merah* (FTIR) tipe IRPrestige-21 Shimadzu, alat soxhlet, alat pengukurpH (pH meter), labu Kjeldahl, *hot plate*, tanur pengabuanfurnace dan alat pengujian bioavailabilitas (tabung Crane dan Wilson, *shaker waterbath*, selang, tabung oksigen, flowmeter).

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen memiliki tujuan umum yaitu untuk menyelidiki adanya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Tohopi *et al.*, 2013). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan bandeng menggunakan larutan asam. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas meliputi :
 - Limbah tulang ikan bandeng
 - Lama perendaman(24, 48 dan 72 jam)
2. Variabel terikat meliputi rendemen, kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar protein, kadar kalsium, derajat putih, pH,, kelarutan kalsium, ukuran partikel, gugus fungsi dan bioavailabilitas.

Eksperimen ini dilakukan dengan perlakuan waktu perendaman yang berbeda dalam larutan asam. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu

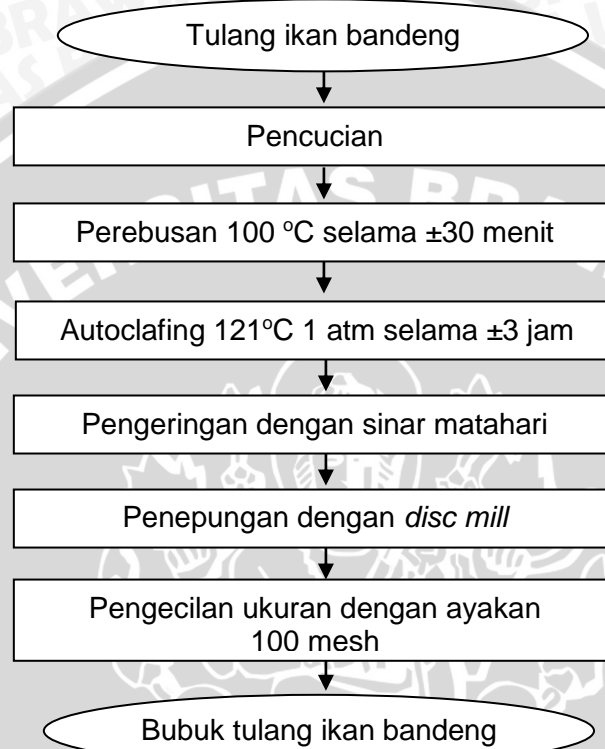
preparasi bahan baku, ekstraksi nanokalsium dan analisis sampel terhadap beberapa parameter uji. Analisis yang dilakukan terhadap bahan baku dan nanokalsium tulang bandeng yaitu analisis sifat fisikokimia yang meliputi rendemen, derajat putih, ukuran partikel (PSA), derajat keasaman (pH), kelarutan kalsium, kadar air, abu, lemak, protein, kadar kalsium (Ca) dengan AAS, analisis gugus fungsi (FTIR) serta analisis bioavailabilitas secara *in vitro*.

3.3.1 Preparasi Bahan Baku

Tahap pertama yaitu preparasi bahan baku (bubuk tulang ikan bandeng), yaitu bertujuan untuk menghasilkan bahan baku tulang ikan bandeng yang siap diekstraksi. Preparasi bahan baku ini melalui beberapa tahapan proses seperti pencucian, perebusan, autoclaving, pengeringan dan penepungan menggunakan *disc mill*.

Metode pembuatan bubuk tulang ikan bandeng dalam penelitian ini, merupakan modifikasi dari beberapa metode yang sebelumnya telah dilakukan yaitu kombinasi antara metode Trilaksani *et al.* (2006) dan Thalib (2009). Pembuatan bubuk tulang ikan bandeng dimulai dari membersihkan tulang ikan. Tulang ikan dicuci dan dibersihkan untuk menghilangkan kotoran. Bagian sirip ekor, sirip punggung, sirip anal dan *finlet* yang masih melekat pada tulang dihilangkan. Tulang kemudian direbus dalam panci aluminium selama ± 30 menit pada suhu 100°C . Perebusan ini dilakukan untuk mempermudah pembersihan tulang dari daging, darah dan lemak yang menempel pada tulang. Proses selanjutnya, tulang ikan dimasukkan ke dalam autoklaf selama ± 3 jam pada suhu 121°C dengan tekanan uap absolut sebesar 1 atm. Fungsi dari proses ini adalah untuk menghilangkan lemak yang terdapat pada tulang serta mengempukkan tulang ikan sehingga mempermudah proses selanjutnya. Tulang ikan tersebut selanjutnya dipotong-potong untuk mendapatkan ukuran yang lebih kecil dan dilakukan pengeringan menggunakan sinar matahari. Tahap terakhir

pada proses pembuatan bubuk tulang ikan bandeng adalah penepungan menggunakan *disc mill* dan dilakukan pengayakkan menggunakan ayakan 100 *mesh*. Diagram alir pembuatan bahan baku (bubuk tulang ikan bandeng) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Preparasi Bahan Baku Bubuk Tulang Ikan Bandeng
Keterangan: ○ = Input/output, □ = Proses

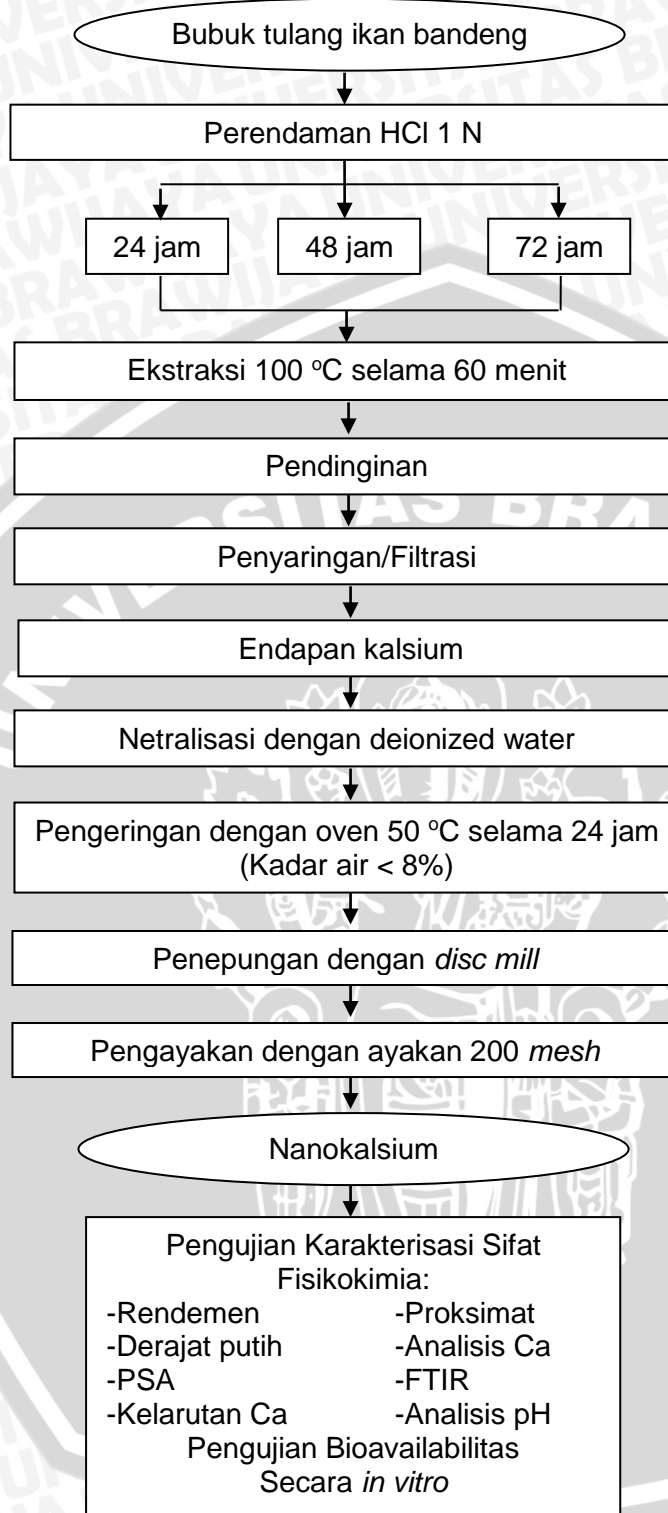
3.3.2 Ekstraksi Nanokalsium

Ekstraksi nanokalsium dilakukan dengan metode presipitasi menggunakan larutan asam (HCl), dengan perlakuan waktu perendaman yang berbeda. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan bubuk kalsium tulang ikan yang lebih murni dengan ukuran yang lebih kecil (nano).

Pembuatan nanokalsium merupakan modifikasi Suptijah (2009) dan Lekahena *et al.* (2014), menggunakan metode presipitasi yang dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan didalam larutan melalui pengaturan pH. Bubuk

tulang ikan bandeng dilakukan perendaman menggunakan HCl 1 N dengan perbandingan antara pelarut dan sampel sebesar 1:3. Waktu perendaman tulang ikan bandeng selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Selanjutnya diekstraksi pada suhu 100 °C selama 60 menit. Proses perendaman yang diikuti pemanasan dapat meningkatkan kandungan kalsium (Udensi *et al.*, 2009). Hasil ekstraksi kemudian didinginkan dan dilakukan filtrasi dengan kertas saring yang dibantu dengan pompa vacum sehingga diperoleh filtrat dan residu. Residu selanjutnya dinetralkan menggunakan aquades hingga pH sampel netral. Residu yang sudah netral kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 24 jam hingga kadar air kurang dari 8%.

Tahap selanjutnya pada pembuatan nanokalsium tulang ikan bandeng adalah proses penepungan menggunakan *disc mill*. Tahap terakhir yaitu *grading* dengan ayakan. Nanokalsium yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 200 *mesh* (200 lubang setiap inchi) sehingga didapatkan bubuk nanokalsium yang halus dan homogen. Nanokalsium hasil ekstraksi asam yang diayak dengan ayakan 100 *mesh* mampu menghasilkan ukuran partikel sebesar 242,35 nm (Lekahena *et al.*, 2014). Sedangkan dalam penelitian ini digunakan ayakan 200 *mesh* yang diharapkan dapat menghasilkan ukuran yang lebih kecil dari ukuran partikel dengan ayakan 100 *mesh*. Diagram alir pembuatan bubuk nanokalsium tulang ikan bandeng dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram alir pembuatan bubuk nanokalsium tulang ikan bandeng (modifikasi metode Suptijah 2009)

Keterangan: ○ = Input/output, □ = Proses

3.4 Parameter Uji

Parameter yang diamati pada nanokalsium tulang ikan bandeng yaitu parameter fisik meliputi rendemen, derajat putih dan ukuran partikel (PSA), parameter kimia meliputi kadar air, abu, lemak, protein, kadar kalsium, analisis kelarutan kalsium, pH dan analisis gugus fungsi nanokalsium (FTIR), serta parameter bioavailabilitas nanokalsium.

3.4.1 Karakterisasi Fisikokimia

3.4.1.1 Pengukuran Rendemen Nanokalsium (AOAC, 2005)

Rendemen adalah persentase perbandingan produk akhir dengan bahan baku yang dinyatakan dalam desimal atau persen. Sehingga pada penelitian ini rendemen yang dihitung merupakan persentase perbandingan berat produk akhir (bubuk nanokalsium) terhadap berat bahan baku (tulang ikan bandeng). Nilai rendemen ini berguna untuk mengetahui nilai ekonomis suatu produk atau bahan. Apabila nilai rendemen suatu produk atau bahan semakin tinggi, maka nilai ekonomisnya juga semakin tinggi sehingga pemanfaatannya dapat menjadi lebih efektif. Prosedur analisa rendemen dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1.2 Penetapan Kadar Air Nanokalsium Metode Thermogravimetri (AOAC, 2005)

Analisis kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang dimiliki oleh nanokalsium tulang ikan bandeng karena kandungan air dalam bahan makanan menentukan daya tahan suatu bahan (Winarno, 1997). Uji kadar air yang dilakukan berdasarkan metode *thermogravimetri* yaitu mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105 – 110°C selama 2-5 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air yang diuapkan. Prosedur pengujian kadar air dapat dilihat pada lampiran 2.

3.4.1.3 Penetapan Kadar Lemak Nanokalsium Metode Soxhlet (AOAC, 2005)

Metode yang digunakan dalam analisis lemak adalah metode ekstraksisoxhlet. Labu lemak yang akan digunakan dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam, kemudiandidinginkan dalam desikator dan ditimbang beratnya. Sampel sebanyak 1 g dalambentuk tepung dibungkus dalam kertas saringdandiletakkan dalam alat ekstraksi soxhlet, kemudian dipasang alat kondensor diatasnya dan labu lemak dibawanya. Pelarut PE (petroleum eter) dituangkan kedalam labu lemak secukupnya dan dilakukanrefluks selama 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke dalam labu lemakberwarna jernih.Pelarut yang ada dalam labu lemak didestilasi, dan pelarut ditampungkembali. Kemudian labu lemak berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama ± 5 jam hingga mecapai berat tetap, kemudian didinginkandalam desikator. Selanjutnya labu beserta lemak didalamnya ditimbang. Prosedur pengujian kadar lemak dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.1.4 Penetapan Kadar Abu Nanokalsium (AOAC, 2005)

Prinsip kerja penentuan kadar abu adalah membakar bahan dalam tanur atau tungku(*furnace*) dengan suhu 600°C selama 6 – 8 jam sehingga seluruh unsur utama pembentuk senyawa organik (C, H, O, N) habis terbakar dan berubah menjadi gas dan sisanya adalah abu yang merupakan kumpulan dari mineral-mineral. Prosedur pengujian kadar abu dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.4.1.5 Penetapan Kadar Protein Nanokalsium Metode Mikro Kjeldhal (AOAC, 2005)

Penetapan kadar protein dilakukan berdasarkan metode mikro Kjeldhal yang meliputi tiga tahap yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Pada tahap destruksi dilakukan pemanasan sampel dalam labu Kjeldhal dengan menambahkan

larutan asam pekat. Selanjutnya pada tahap destilasi ditambahkan larutan NaOH 40 % sehingga pada tahap ini dihasilkan destilat. Hasil destilat tersebut kemudian dititrasi. Hasil titrasi tersebut digunakan untuk menghitung % N dan selanjutnya dapat diketahui % P. Prosedur pengujian kadar protein dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.4.1.6 Penetapan Kadar Kalsium Metode AAS(Apriyantono *et al.*, 1989)

Penetapan kadar kalsium dilakukan dengan mengukur sampel yang sudah di destruksi secara basah pada *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (AAS) dengan menggunakan panjang gelombang 422,7 nm. Sampel didestruksi dengan campuran asam kemudian dipisahkan dari residunya.

a. Persiapan sampel dengan metode pengabuan basah

Analisis kadar kalsium sampel dilakukan dengan menimbang 0,1 gram sampel halus yang kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 100 ml dan ditambahkan 10-13 ml campuran asam yang terdiri dari HNO₃65%, HClO₄ 60% dan HCl 37% (perbandingan 6:6:1), larutan didestruksi sampai berwarna jernih kemudian didinginkan. Setelah dingin, campuran hasil destruksi disaring dengan kertas saring Whatman. Pada saat penyaringan, labu Kjeldahl dan corong dibilas dengan air bebas ion sebanyak 4 kali. Volume hasil penyaringan ditera hingga 100 ml dan siap diukur pada AAS dengan panjang gelombang 422,7 nm.

b. Persiapan larutan stok standart

Larutan stok standar kalsium 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 2,497 g CaCO₃ kemudian dilarutkan dengan asam nitrat 1:4 sampai 1 liter. Larutan standar dibuat dari larutan stok 1000 ppm. Seri larutan standar yang digunakan adalah 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dengan volume 100 ml. Larutan standar tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan AAS. Berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan AAS pada seri larutan standar, diperoleh

hubungan antara konsentrasi dengan absorban melalui persamaan garis lurus y = a + bx (y sebagai absorban dan x sebagai konsentrasi). Perhitungan kadar kalsium ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{ppm Ca} = \frac{(\text{absorban sampel} - \text{absorban blanko}) \times \text{ml aliquot} \times \text{FP}}{\text{Berat sampel}}$$

FP = Faktor pengenceran

$$\% \text{ Ca} = \frac{\text{ppm Ca}}{1.000.000} \times 100\%$$

3.4.1.7 Analisis Derajat Putih Metode *Color Reader* (Eom *et al.*, 2013)

Pengukuran derajat putih bubuk nanokalsium dilakukan dengan menggunakan alat *Color Reader CR-10* merek *Konica Minolta Sensing Inc.* Prinsip kerja alat ini adalah mendapatkan warna berdasarkan daya pantul dari bubuk nanokalsium terhadap cahaya yang diberikan oleh *chromameter*. System warna yang digunakan adalah *Hunter's Lab Colorimeter System* yang dicirikan dengan tiga nilai yaitu L (*Lightness*), a* (*Redness*), dan b* (*Yellowness*). Sampel diletakkan pada cawan dengan lebar 1 cm. Warna dibaca menggunakan *chroma meter* dimana diperoleh data hasil pengujian yaitu L*, a* dan b*. Dari ketiga komponen tersebut dapat diketahui besarnya derajat keputihan nanokalsium tulang ikan bandeng dengan menggunakan persamaan (Eom *et al.*, 2013), yaitu sebagai berikut:

$$W = (L^* - 3b^*)$$

Keterangan:

W = derajat keputihan

L* = kecerahan

b* = kekuningan/kebiruan

3.4.1.8 Analisis Derajat Keasaman (pH) Metode pH meter (AOAC, 1995)

Sampel sebanyak 1 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 ml, kemudian ditambahkan 10 ml aquades pH 7 dan dilakukan pengadukan.

Sampel dalam wadah diukur pH nya dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan buffer pH 4 dan larutan buffer pH 7. Elektroda yang telah dibersihkan, dicelupkan ke dalam sampel yang akan diperiksa. Nilai pH diperoleh berdasarkan hasil pembacaan pada pH meter sampai angka digital menunjukkan nilai konstan.

3.4.1.9 Analisis Kelarutan Kalsium (Santoso *et al.*, 2008)

Sampel sebanyak 2 g ditambahkan kedalam 8ml larutan 0.5% asam asetat dan dihomogenkan dengan menggunakan homogenizer pada kecepatan 5000-10000 rpm selama 2 menit, untuk menghasilkan fraksiterlarut. Kemudian sampel tersebut dipanaskan dengan menggunakan *hotplate* pada suhu 100 °C selama 20 menit dan disentrifus pada kecepatan 10000 rpm, selama 10 menit. Hasil dari sentrifus selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no 42. Hasil filtrasi tersebut selanjutnya diukur dengan menggunakan AAS. Persentase mineral terlarut dihitung dengan membandingkan jumlah mineral terlarut dengan total mineral awal berdasarkan persamaan berikut:

$$\% \text{ Kelarutan} = \frac{\text{Kadar Ca sampel terlarut}}{\text{Kadar Ca sampel awal}} \times 100\%$$

3.4.1.10 Analisis Ukuran Partikel dengan *Particle Size Analyzer* (Sudarmaji, 2012)

Particle size analyzer (PSA) merupakan alat untuk mengetahui ukuran partikel yang menggunakan metode *Laser Diffraction (LAS)*. Metode LAS yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode basah yaitu menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji. Pengukuran partikel dengan metode basah ini lebih akurat jika dibandingkan metode kering maupun pengukuran partikel dengan metode ayakan dan analisa gambar. PSA dapat mengukur ukuran partikel berkisar 2 nm sampai 3000 nm.

a. Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 g sampel didispersikan dalam 50 ml aquadest, kemudian dihomogenkan dengan magnetik *stirer* sampai tidak terjadi endapan. Selanjutnya koloid sampel diambil sebanyak 3 ml dan dimasukkan dalam cuvet.

b. Prosedur Pengujian dengan PSA

Menyalakan alat dan perangkat komputer, kemudian ditunggu sampai posisi siap digunakan. Alat dikalibrasi menggunakan air destilasi dan ditunggu sampai alat menyatakan siap digunakan. Setelah sampel siap, dimasukkan cuvet yang berisi sampel kedalam *cell area*. Kemudian buka program dengan memasukkan data nama file serta jenis polimer untuk mendapatkan referensi indeks bias sampel. Jika indeks bias sudah didapat, selanjutnya tekan tombol "OK" untuk menyatakan bahwa proses pengukuran siap dijalankan. Selanjutnya ditekan tombol *power light*. Jika *power light* sudah masuk, ditekan tombol "START" untuk memulai pengukuran. Hasil pengukuran ditunggu 15 menit sejak pengukuran dimulai.

3.4.1.11 Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR (Sari, 2011)

Uji karakteristik gugus fungsi nanokalsium menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Pengujian ini dilakukan dengan menyalakan alat penguji FTIR dan komputer penghubung software yang digunakan untuk menganalisa. Adapun tahap-tahap pengujiannya sebagai berikut:

a. Preparasi sampel

Preparasi sampel diawali dengan penyiapan sampel padatan menggunakan metode pelet KBr. Sampel sebanyak 2 mg dihaluskan dengan mortal hingga halus dan dimasukkan ke dalam lumping agate, kemudian di tambahkan bubuk KBr murni (± 100 mg). Campuran ini kemudian dihomogen dan ditempatkan ke dalam diffuse reflectance attachment serta diberi tekanan 7-8 ton dengan menggunakan alat tekanan mekanik. Tekanan ini dipertahankan

beberapa menit, kemudian sampel yang terbentuk (kepingan tipis) diambil dan dimasukkan ke dalam chamber FTIR, untuk direkam spektrum dari sampel pada frekuensi 4000-400 cm^{-1}

b. Identifikasi gugus fungsi

Spektrum IR yang dihasilkan dapat ditentukan gugus fungsi yang terdapat pada sampel dengan melihat pola serapan yang dihasilkan dan membandingkan harga frekuensi yang diperoleh dengan data yang ada pada tabel. Kemudian data tersebut diinterpretasikan secara hati-hati dan terintegrasi hingga area sidik jari.

3.4.2 Analisis Bioavailabilitas secara *In Vitro* Metode Kantung Usus Terbalik (Astuti, 1989)

a. Persiapan hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih Wistar (*Ratus norvegicus*) jantan dalam keadaan sehat. Hewan ini memiliki struktur anatomi fisiologi yang hampir sama dengan manusia. Sehingga hasil uji pada usus tikus putih dapat diaplikasikan pada manusia. Tikus diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dengan menempatkan pada kandang individu dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Tikus diberi obat cacing dengan cara disondekansatu kali selama masa adaptasi, dosis yang diberikan disesuaikan dengan berat badan tikus. Adapun berat badan tikus yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ± 250 gram. Tujuan pemberian obat cacing ini yaitu untuk membersihkan usus tikus agar tidak mempengaruhi hasil pengujian. Selanjutnya tikus ini siap untuk dibedah dan diambil ususnya untuk dilakukan pengujian bioavailabilitas secara *in vitro*.

Hewan percobaan sebelum dibedah dipuasakan selama 20-24 jam, tetapi diberi minum *deionized water*. Tikus dibunuh dengan eter, kemudian dibuka perutnya di sepanjang linea medianadan usus dikeluarkan. Setelah itu, usus

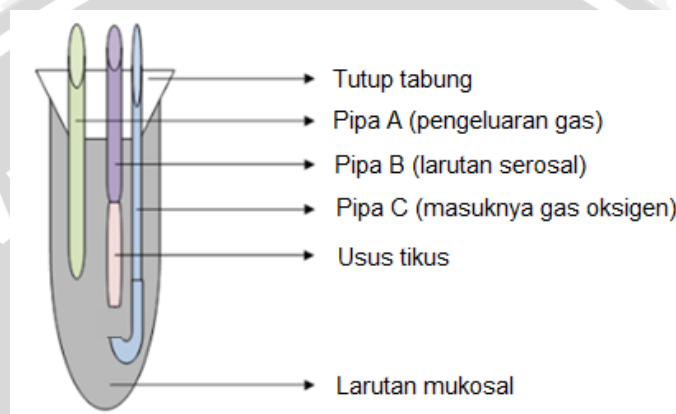
sepanjang 15 cm di bawah pylorusdibuang dan 20 cm di bawahnya dipotong untuk percobaan. Selanjutnya usus dibagi dua sama panjang masing-masing ± 10 cm dan dibersihkan dengan larutan 0,9% NaCl. Bagian yang dekat dengan anal (bagian bawah) digunakan sebagai kontrol dan bagian atas lambung digunakan untuk percobaan. Ujung anal (bagian bawah) dari potongan usus tersebut diikat dengan benang, kemudian dengan menggunakan batang gelas yang berdiameter 2 mm usus tersebut dibalik sehingga bagian mukosa terletak diluar.

b. Cara Analisis

Usus diukur dengan panjang efektif 7 cm dan diisi dengan 1,4 mL cairan serosal (larutan NaCl 0,9% b/v). Ujung usus bagian atas disambungkan ke pipa B (bagian kanula dari tabung Crane dan Wilson) dan diikat dengan benang agar tidak mudah lepas. Instrument tabung Crane dan Wilson dapat dilihat pada Gambar 5. Kemudian usus yang sudah diisi dengan cairan serosal, dimasukkan ke dalam tabung Crane dan Wilson yang telah diisi 25 mL cairan mukosal (larutan pepsin HCl yang dibuat dari 0,5 g pepsin dilarutkan dalam 100 ml HCl 0,1 N pH campuran disesuaikan menjadi 1,35). Cairan mukosal ini mengandung 2 g sampel yang dicampurkan dengan 25 ml larutan pepsin HCl dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam *shaker waterbath* selama 90 menit. Selanjutnya untuk dapat diabsorpsi oleh usus halus maka pH cairan mukosal harus diubah menjadi 7,4 dengan menambahkan NaOH 0,1 N hingga pH naik menjadi 7,4. Tabung yang berisi cairan mukosal pH 7,4 (yang mengandung sampel) dan untuk kontrol tanpa sampel diinkubasi pada suhu 37°C dalam *shaker waterbath*. Sampel yang akan diuji dalam percobaan ini adalah nanokalsium.

Selama percobaan berlangsung, seluruh bagian usus dijaga agar dapat terendam dalam cairan mukosal dan selalu dialiri gas oksigen (melalui pipa C) dengan kecepatan ± 100 gelembung per menit. Untuk larutan uji (berisi sampel)

pada menit ke 10, 20, dan 30, cairan serosal diambil melalui kanula pipa B dan dimasukkan ke dalam vial kemudian usus diisi lagi dengan 1,4 ml NaCl 0,9% b/v. Untuk kontrol (tanpa sampel, setelah 10 menit cairan serosal diambil melalui kanula dan dimasukkan ke dalam vial. Kemudian masing-masing cairan dalam vial diuji kadar kalsium yang diserap dengan AAS. Gambar alat yang digunakan untuk percobaan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Instrumen Tabung Crane dan Wilson

$$\% \text{ Bioavailabilitas} = \frac{\text{Jumlah Ca yang diserap usus}}{\text{Jumlah Ca awal dalam tabung}} \times 100\%$$

3.5 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan satu faktor, digunakan RAL karena media percobaan bersifat homogen yaitu dianggap tidak ada faktor lain yang berpengaruh serta percobaan yang dilakukan bersifat terkontrol (terkendali). Perlakuan yang dilakukan sebanyak tiga taraf perlakuan (24 jam; 48 jam; dan 72 jam) dan lima kali ulangan. Ulangan berfungsi untuk mempertinggi ketepatan pengukuran pengaruh perlakuan, mengurangi kesalahan serta menyediakan taksiran yang lebih teliti. Menurut Sastrosupadi (2000), banyaknya jumlah ulangan yang diperlukan bagi suatu percobaan didasarkan atas biaya, tenaga, waktu, keseragaman bahan

percobaan (homogen) dan derajat ketelitian yang diinginkan. Sehingga dalam percobaan ini dilakukan lima kali ulangan. Model rancangan percobaan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
P ₀	P _{0.1}	P _{0.2}	P _{0.3}	P _{0.4}	P _{0.5}
P ₁	P _{1.1}	P _{1.2}	P _{1.3}	P _{1.4}	P _{1.5}
P ₂	P _{2.1}	P _{2.2}	P _{2.3}	P _{2.4}	P _{2.5}
P ₃	P _{3.1}	P _{3.2}	P _{3.3}	P _{3.4}	P _{3.5}

Keterangan :

P₀ : Serbuk tulang ikan bandeng tanpa perendaman dengan HCl 1 N

P₁: Perendaman serbuk tulang ikan bandeng dalam larutan HCL 1 N selama 24 jam

P₂: Perendaman serbuk tulang ikan bandeng dalam larutan HCL 1 N selama 48 jam

P₃: Perendaman serbuk tulang ikan bandeng dalam larutan HCL 1 N selama 72 jam

Penelitian ini menggunakan analisis data statistik yaitu analisis sidik ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan sebesar 95%. Adapun ANOVA (*Analysis Of Variant*) memiliki model rancangannya sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : Hasil pengamatan (parameter yang diuji) pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ : Nilai rata-rata umum

τ_i : Pengaruh perbedaan waktu perendaman pada taraf ke-i terhadap parameter

ϵ_{ij} : Pengaruh galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ulangan ulangan ke-j

i : Perbedaan waktu perendaman (perlakuan)

j : Ulangan (1, 2, 3)

Apabila hasil analisis sidik ragam menunjukkan adanya pengaruh yang nyata/sangat nyata maka dilanjutkan dengan analisis beda nyata terkecil (BNT)

dengan rumus sebagai berikut: $BNT = t\alpha; db \text{ galat } \sqrt{\frac{KTG}{r}}$

Keterangan:

KTG : Kuadrat tengah galat

$t\alpha$: Nilai t tabel pada $\alpha = 5\%$

db galat : Derajat bebas galat

r : Banyaknya ulangan



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

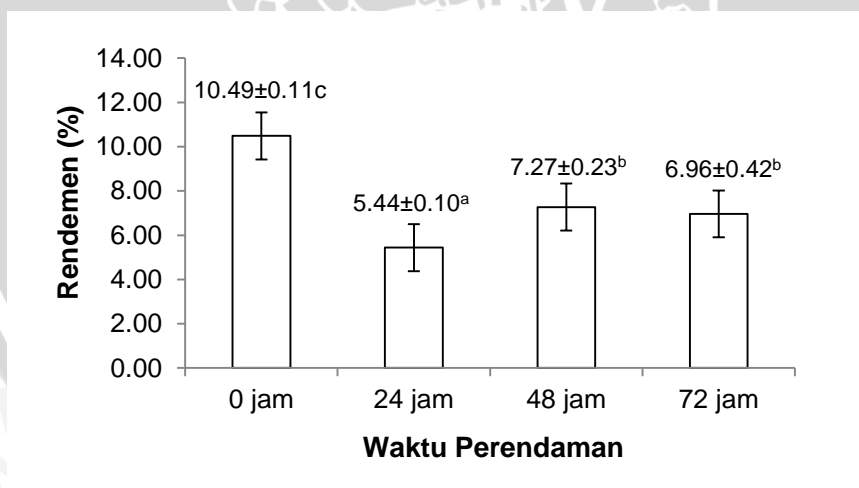
4.1 Karakterisasi Fisikokimia Nanokalsium

Karakteristik fisikokimia nanokalsium tulang ikan bandeng merupakan analisis fisik dan kimia yang meliputi rendemen, proksimat, kadar kalsium, derajat putih, pH, kelarutan kalsium, distribusi ukuran partikel dan gugus fungsi.

4.1.1 Rendemen

Rendemen merupakan salah satu parameter penting untuk mengetahui nilai ekonomis suatu produk atau bahan selain dari faktor kualitas produk itu sendiri. Semakin besar rendemennya maka semakin tinggi pula nilai ekonomis produk tersebut, begitu pula sebaliknya.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 14) menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 15) secara umum dapat dilihat pada Gambar 6.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 6. Grafik hubungan rendemen serbuk nanokalsium dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 6 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 48 jam menghasilkan nilai rendemen yang berbeda nyata dengan

nilai rendemen pada perlakuan perendaman 24 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 72 jam. Hal ini terlihat bahwa antara perlakuan perendaman 48 jam dengan 72 jam menghasilkan rendemen yang relatif sama. Semakin lama waktu perendaman, maka semakin besar rendemen yang dihasilkan hingga terjadi kesetimbangan konsentrasi dalam larutan yang disebut titik jenuh. Rendemen pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam berbeda nyata dengan rendemen pada 0 jam (kontrol) dan memiliki nilai yang lebih kecil. Kontrol yang digunakan pada penelitian ini merupakan bahan baku serbuk tulang ikan bandeng tanpa dilakukan perendaman. Pada sampel kontrol masih terdapat komponen organik seperti protein dan lemak, sedangkan sesudah diberi perlakuan perendaman komponen organik seperti protein dan lemak terhidrolisis oleh larutan asam sehingga menurunkan rendemen bahan. Rendemen pada perlakuan perendaman 48 jam tidak berbeda nyata dengan perlakuan 72 jam dikarenakan larutan sudah mengalami titik jenuhnya sehingga rendemen tidak bertambah. Suptijah *et al.* (2012), menyebutkan bahwa waktu perendaman 48 jam menghasilkan rendemen nanokalsium yang optimum, karena komponen mineral dapat terekstrak dengan optimum. Hal ini didukung oleh Suryandari (1981) bahwa semakin lama waktu ekstraksi maka rendemen yang dihasilkan semakin tinggi, karena kesempatan kontak antara bahan dan pelarut semakin besar, namun apabila waktu ekstraksi terlalu lama, rendemen akan menurun kemungkinan karena larutan sudah mencapai titik jenuh. Sehingga perlakuan perendaman 48 dan 72 jam merupakan perlakuan terbaik untuk menghasilkan rendemen yang optimum.

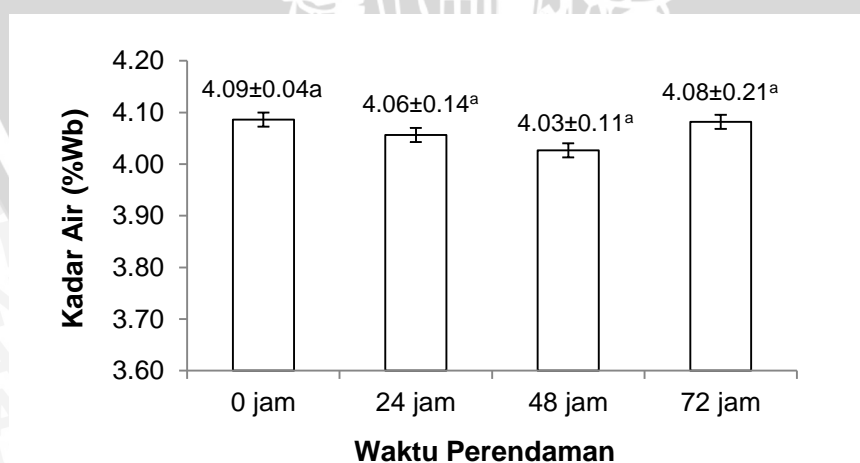
Rendemen nanokalsium pada penelitian ini tergolong rendah bila dibandingkan dengan rendemen nanokalsium dari cangkang udang pada penelitian Suptijah (2012) yaitu berkisar antara 11,76% - 14,06%. Hal ini dikarenakan bahan baku yang digunakan berbeda sehingga kemampuan

ekstraksi juga yang berbeda. Tulang ikan bandeng merupakan tulang keras sehingga pada proses ekstraksi pemutusan ikatan hidrogen semakin lama maka rendemen yang dihasilkan tidak sebanyak rendemen pada cangkang udang.

4.1.2 Kadar Air

Air merupakan komponen utama dalam bahan makanan yang sangat mempengaruhi daya tahan bahan pangan. Daya tahan bahan hasil olahan sangat berkaitan dengan kandungan air karena air merupakan komponen penting yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk berkembangbiak dalam produk olahan (Maulida, 2005). Hal ini merupakan salah satu sebab mengapa di dalam pengolahan pangan, air sering dikeluarkan atau dikurangi dengan cara penguapan atau pengeringan. Batas kadar air minimal bagi mikroba untuk dapat tumbuh adalah 14-15 % (Fardiaz *et al.*, 1992).

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 17) kadar air nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman tidak memberikan pengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar air nanokalsium yang dihasilkan sehingga tidak dilakukan uji lanjut. Hasil analisis kadar air nanokalsium secara umum dapat dilihat pada Gambar 7.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($p > 0,05$)

Gambar 7. Grafik hubungan kadar air dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 7 terlihat bahwa notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata. Hal ini dikarenakan proses pengeringan menggunakan alat pengering yaitu oven listrik yang dikontrol dengan waktu yang sama dan keseragaman suhu yang sama sehingga kadar air nanokalsium relatif sama. Hal ini didukung oleh Hemung (2013), bahwa molekul air tidak termasuk ke dalam jaringan tulang tetapi terikat lemah pada permukaan tulang. Oleh karena itu, komponen air dapat hilang hampir sepenuhnya selama pengeringan dengan oven. Selain itu, dengan kadar air yang rendah bubuk nanokalsium akan stabil pada suhu kamar, serta aglomerasi tidak terjadi selama penyimpanan. Bentuk yang stabil ini memudahkan untuk menggunakan bubuk nanokalsium sebagai bahan dalam berbagai aplikasi.

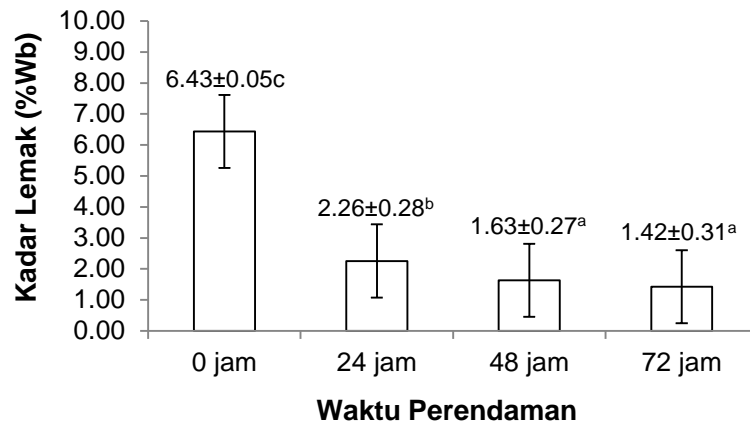
Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai kadar air serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng relatif rendah. Nilai kadar air nanokalsium tulang ikan bandeng ini tidak jauh berbeda dengan kadar air nanokalsium tulang ikan nila penelitian Lekahena *et al.* (2014), yaitu 4,34%. Nilai kadar air ini termasuk rendah dan masih memenuhi standar bahan tepung tepungan yang ditetapkan SNI. Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI, 1992), tepung tulang memiliki kadar air maksimal 8 %. Produk dengan kadar air yang rendah akan mempunyai daya awet yang lebih lama.

4.1.3 Kadar Lemak

Lemak dalam makanan memegang peranan penting untuk menjaga kesehatan tubuh manusia dan sebagai sumber energi yang lebih efektif dibandingkan dengan karbohidrat dan protein (Winarno, 1997). Namun untuk produk bubuk tulang ikan, kadar lemak yang rendah lebih diharapkan karena mutu produk akan lebih stabil dan tidak mudah rusak.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 19) kadar lemak nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman

memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar lemak serbuk nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 20) secara umum dapat dilihat pada Gambar 8.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 8. Grafik hubungan kadar lemak dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 8 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jam menghasilkan nilai kadar lemak yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 48 dan 72 jam, sedangkan perlakuan 48 jam tidak berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 72 jam. Perlakuan perendaman 48 jam memiliki nilai kadar lemak yang tidak berbeda jauh dengan kadar lemak pada perlakuan perendaman 72 jam. Kadar lemak mengalami penurunan dengan semakin lamanya waktu perendaman, namun pada perlakuan perendaman 48 jam dan perendaman 72 jam tidak berbeda nyata karena larutan sudah mencapai titik jenuhnya sehingga kemampuan untuk menghidrolisis lemak semakin berkurang. Sedangkan pada kontrol (0 jam) berbeda nyata dengan perlakuan 24, 48 dan 72 jam. Pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam memiliki nilai kadar lemak yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol, hal ini dikarenakan perlakuan perendaman menggunakan larutan asam sehingga lemak terhidrolisis dengan adanya perlakuan perendaman

Hasil penelitian menunjukkan nilai kadar lemak serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng relatif rendah dan tidak jauh berbeda dengan kadar lemak nanokalsium tulang ikan nila pada penelitian Lekahena *et al.* (2014), yaitu sebesar 1,79%. Nilai ini masih berada di bawah kisaran standar kadar lemak yang ditetapkan SNI. Kadar lemak Standar Nasional Indonesia untuk tepung tulang ikan yang ditetapkan sebesar 3 – 6 (% bb) masing-masing untuk mutu I dan II. Kadar lemak yang rendah ini lebih diharapkan karena kadar lemak yang rendah membuat mutu relatif lebih stabil dan tidak mudah rusak. Kadar lemak yang tinggi dapat menyebabkan tepung mempunyai citarasa ikan (*fish taste*) dan menyebabkan terjadinya *oxydative rancidity* sebagai akibat oksidasi lemak (Almatsier, 2002).

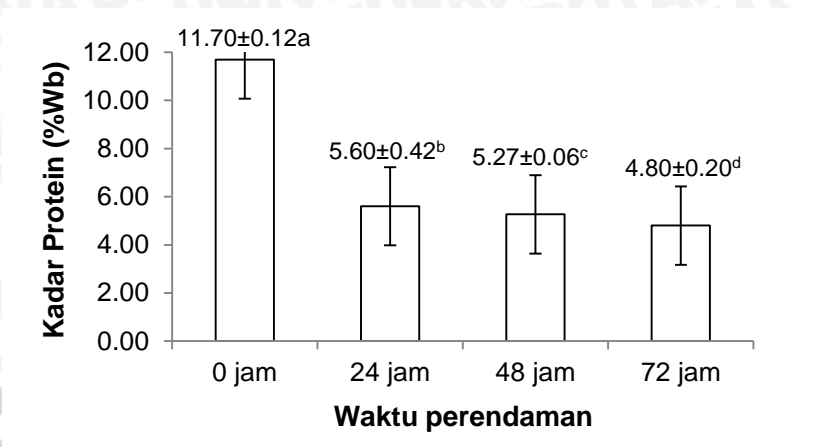
Kadar lemak yang rendah yaitu pada perlakuan perendaman 48 dan 72 jam, ini berbanding lurus dengan kadar kalsium tertinggi yaitu pada perlakuan perendaman 72 jam. Menurut Lekahena *et al.* (2014), dengan ekstraksi menggunakan asam dapat mengakibatkan terhidrolisisnya lemak yang terdapat dalam matriks tulang sehingga dapat meningkatkan kadar kalsium.

4.1.4 Kadar Protein

Protein merupakan suatu zat makanan yang penting bagi tubuh karena zat ini disamping berfungsi sebagai bahan bakar dalam tubuh juga berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur (Winarno, 1997). Namun dalam pembuatan nanokalsium tulang ikan, protein dihilangkan semaksimal mungkin dengan proses hidrolisis protein. Penghilangan protein ini dimaksudkan untuk meningkatkan kadar mineral/abu yang terkandung dalam bubuk nanokalsium.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 22) kadar protein nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap penurunan kadar protein

nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 23) secara umum dapat dilihat pada Gambar 9.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 9. Grafik hubungan kadar protein dengan lama waktu perendaman yang berbeda

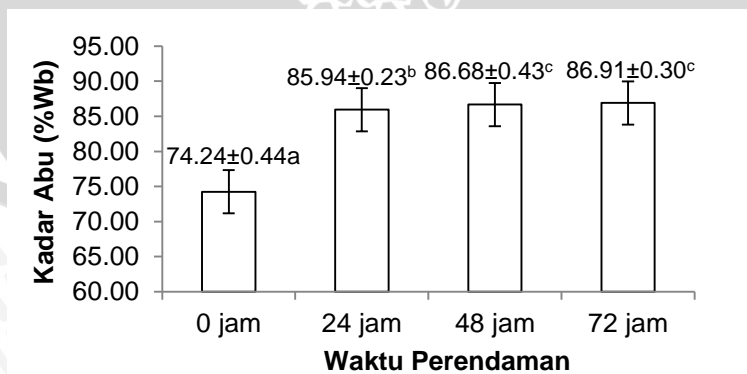
Grafik histogram pada Gambar 9 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jammenghasilkan nilai kadar protein yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 48 jam dan perendaman 72 jam. Hal ini terlihat bahwa kadar protein mengalami penurunan dengan semakin lamanya waktu perendaman. Kadar protein terendah pada penelitian ini terdapat pada perlakuan perendaman 72 jam. Kadar protein pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam ini juga lebih rendah dibandingkan dengan 0 jam (kontrol). Rendahnya kadar protein ini dikarenakan sebagian besar protein terhidroisis oleh larutan asam pada saat perendaman. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mulyani *et al.* (2004), menjelaskan bahwa hidrolisis protein dapat berlangsung oleh adanya asam. Asam klorida mempunyai kemampuan tinggi untuk menghidrolisis dan mendekomposisi protein. Konsentrasi asam dan kemampuan jenis asam dalam menghidrolisis kolagen akan berpengaruh pada kadar protein yang dihasilkan, karena protein akan mengalami perubahan transformasi pada struktur penyusun protein, konsentrasi asam akan dapat merusakkan struktur dari protein kolagen,

sehingga akan menurunkan kadar protein. Aviana (2003), juga menjelaskan bahwa kadar protein dipengaruhi oleh proses perendaman tulang dimana reaksi pemutusan ikatan hidrogen dan pembentukan struktur koil kolagen terjadi secara optimal sehingga protein terekstrak dan terlepas dari tulang ikan akibatnya menurunkan kadar protein. Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata kadar protein serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng relatif rendah dikarenakan perlakuan perendaman menggunakan larutan asam dapat menghidrolisis protein.

4.1.5 Kadar Abu

Abu merupakan ukuran dari komponen anorganik dalam bahan pangan yang tersisa setelah bahan organik didestruksi (Sulaiman *et al.* 1995). Analisis kadar abu bertujuan untuk menentukan kadar abu total dan kandungan mineral yang terdapat dalam bubuk nanokalsium tulang ikan. Kadar abu merupakan gambaran kasar dari kandungan mineral (Apriantono *et al.* 1989).

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 25) kadar abu nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwaperlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan kadar abu nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 26) secara umum dapat dilihat pada Gambar 10.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 10. Grafik hubungan kadar abu dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 10 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 48 jam menghasilkan nilai kadar abu yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 24 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 72 jam. Kadar abu mengalami kenaikan dengan semakin lamanya waktu perendaman, namun pada perlakuan perendaman 72 jam kadar abu tidak mengalami peningkatan yang signifikan karena larutan sudah mencapai titik jenuhnya sehingga kemampuan untuk mengekstrak mineral semakin berkurang. Kadar abu pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam juga lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar abu 0 jam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nabil (2005), bahwa meningkatnya kadar abu ini disebabkan karena semakin lama waktu hidrolisis yang digunakan maka kontak antara larutan pengeksrak dengan bahan akan semakin lama pula sehingga kesempatan untuk melarutkan komponen nonmineral dalam bahan semakin besar. Semakin rendah komponen non mineral yang terkandung dalam bahan akan semakin meningkatkan persen abu terhadap bahan.

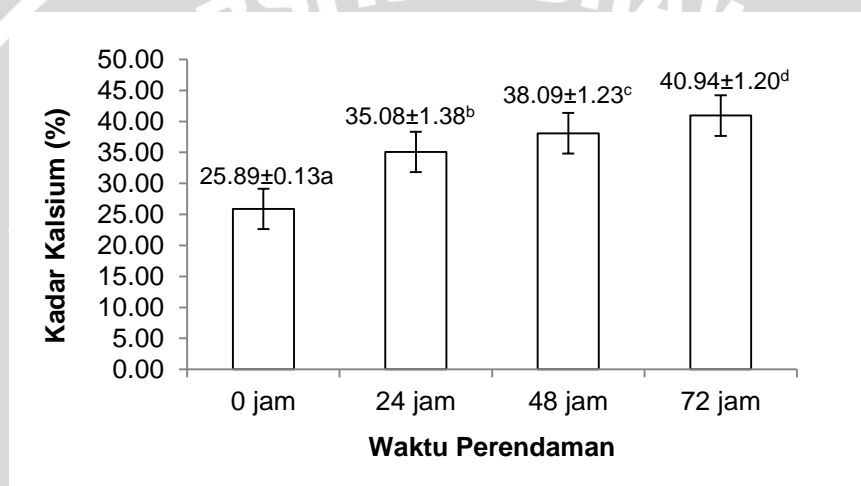
Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata kadar abu serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng relatif tinggi. Kadar abu berhubungan dengan mineral suatu bahan, semakin tinggi kadar abu maka semakin tinggi pula kadar mineral bahan. Kadar abu tertinggi pada penelitian ini yaitu pada perlakuan perendaman 72 jam yaitu 84,06%. Nilai kadar abu ini tidak jauh berbeda dengan kadar abu nanokalsium Lekahena *et al.* (2014) yaitu 85,44%. Tingginya kadar abu berhubungan dengan tingginya kadar kalsium bahan. Kadar abu tertinggi pada perlakuan perendaman 72 jam, berbanding lurus dengan nilai kadar kalsium yaitu juga terdapat pada perlakuan perendaman 72 jam.

4.1.6 Kadar Kalsium

Kalsium merupakan unsur anorganik yang paling banyak di dalam tubuh. Unsur ini terdapat pada hewan dan makanan manusia seperti pada tulang, susu

dan sayuran. Sekitar 99% kalsium di dalam tubuh terdapat di dalam tulang dan gigi. Kalsium bersama dengan fosfor membentuk kristal larut yang disebut kalsium hidroksiapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (Muchtadi *et al.*, 1993).

Hasil analisis ragam (Lampiran 30) kadar kalsium nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan kadar kalsium serbuk nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 31) secara umum dapat dilihat pada Gambar 11.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 11. Grafik hubungan kadar kalsium dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 11 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jam menghasilkan nilai kadar kalsium yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 48 jam dan perendaman 72 jam. Perlakuan perendaman 72 jam memiliki nilai kadar kalsium tertinggi dibandingkan dengan perlakuan perendaman 48 jam dan perendaman 24 jam. Kadar kalsium pada perlakuan perendaman juga berbeda nyata dengan kadar kalsium kontrol (0 jam). Kadar kalsium mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu perendaman. Hal ini dikarenakan waktu perendaman (*retention time*) didalam larutan HCl 1 N dapat mempengaruhi kadar mineral suatu bahan (Mahmoud *et*

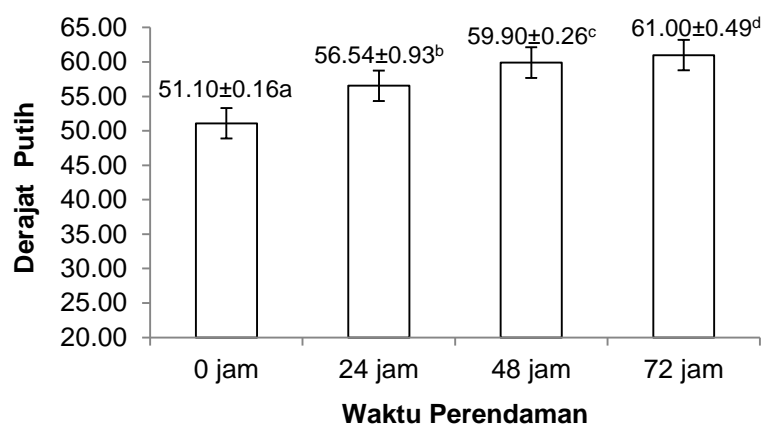
al., 2007). Ditambahkan juga oleh Suptijah (2012), bahwa proses perendaman menggunakan larutan HCl meningkatkan kadar kalsium. Proses perendaman menyebabkan terbukanya pori-pori tulang secara maksimal, sehingga ruang-ruang yang terbentuk memudahkan dicapai oleh pengekstrak (HCl), dengan demikian mineral mudah terekstrak dengan optimum.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata kadar kalsium serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng relatif tinggi. Nilai kadar kalsium ini jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar kalsium pada sampel sebelum diberi perlakuan yaitu sebesar 25,89% (Tabel 3). Hal ini berarti perendaman sampel dengan HCl 1 N berpengaruh terhadap kenaikan kadar kalsium. Nilai kadar kalsium ini berbanding lurus dengan kadar abu tertinggi yaitu terdapat pada perlakuan perendaman 72 jam. Semakin tinggi kadar abu maka semakin tinggi pula kadar kalsium nanokalsium yang dihasilkan.

4.1.7 Derajat Putih

Warna produk makanan merupakan karakteristik pertama yang dilihat untuk penerimaan/penolakan terhadap suatu produk. Pengukuran derajat putih sangat penting untuk dilakukan terhadap jenis bahan tepung-tepungan karena derajat putih merupakan salah satu faktor yang menunjukkan nilai mutu dari bahan tersebut.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 33) derajat putih nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap derajat putih serbuk nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 34) secara umum dapat dilihat pada Gambar 12.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c,d) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 12. Grafik hubungan derajat putih serbuk nanokalsium dengan lama waktu perendaman yang berbeda

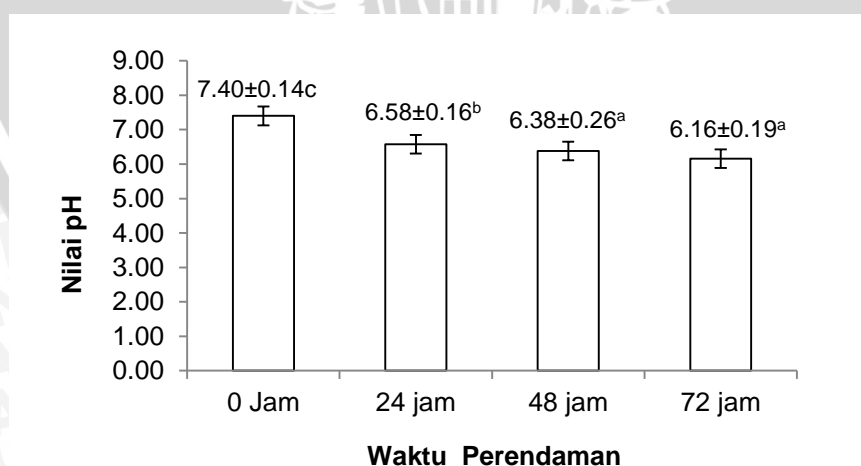
Grafik histogram pada Gambar 12 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jam, perendaman 48 jam dan perendaman 72 jam menghasilkan nilai derajat putih yang berbeda nyata, hal ini dibuktikan dengan adanya notasi yang berbeda. Nilai derajat putih pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam juga lebih tinggi dibandingkan dengan derajat putih pada control (0 jam). Semakin lama waktu perendaman, maka semakin tinggi nilai derajat putih yang dihasilkan. Peningkatan nilai derajat putih ini dikarenakan adanya proses hidrolisis oleh larutan asam, banyaknya bahan organik yang terhidrolisis dan terlarut selama proses perendaman dapat meningkatkan nilai derajat putih (Nabil, 2005). Hal ini didukung oleh Hemung (2013), bahwa warna tepung yang dihasilkan berkaitan dengan senyawa organik yang terdapat dalam tepung. Warna alami tulang ikan adalah putih kekuningan sedangkan serbuk nanokalsium berwarna putih cerah, hal ini juga dikarenakan kalsium memiliki warna putih. Berdasarkan hasil uji lanjut, dapat dilihat bahwa perlakuan perendaman 72 jam memiliki nilai derajat putih yang tinggi dibandingkan perlakuan perendaman 24 jam dan perendaman 48 jam.

Nilai derajat putih nanokalsium tulang ikan bandeng pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan nanokalsium cangkang kijing pada penelitian Khoerunnisa (2011), yaitu sebesar 69,79%. Menurut Suptijah *et al.* (2012), derajat putih nanokalsium dipengaruhi oleh mineral penyusunnya. Rendahnya nilai derajat putih serbuk nanokalsium ini dimungkinkan oleh adanya kandungan mineral lain selain kalsium.

4.1.8 Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman merupakan salah satu faktor dalam penentuan mutu bahan pangan. Proses penyerapan kalsium dalam tubuh dipengaruhi oleh nilai pH. Besarnya nilai pH suatu bahan pangan juga akan mempengaruhi penanganan dan pengolahan bahan makanan tersebut. Nilai pH yang diperoleh dalam penelitian ini diupayakan untuk mencapai pH netral.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 36) pH serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai pH serbuk nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 37) secara umum dapat dilihat pada Gambar 13.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 13. Grafik hubungan pH serbuk nanokalsium dengan lama waktu perendaman yang berbeda

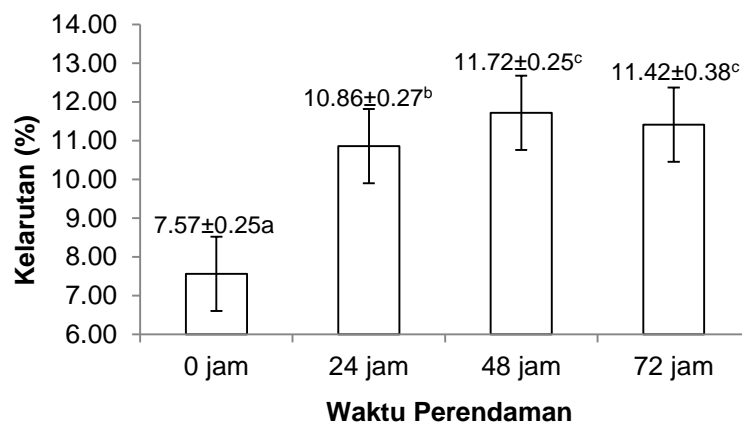
Grafik histogram pada Gambar 13 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jam menghasilkan nilai pH yang berbeda nyata dengan nilai pH pada perlakuan perendaman 72 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 48 jam. Hal ini berarti perlakuan perendaman 24 jam berpotensi menghasilkan nilai pH yang sama dengan perlakuan perendaman 48 jam. Nilai pH pada perlakuan ini juga lebih rendah bila dibandingkan dengan nilai pH sampel kontrol (0 jam). Semakin lama waktu perendaman maka semakin rendah nilai pH nanokalsium yang dihasilkan, ini dikarenakan semakin lama waktu perendaman maka kontak antara pelarut dan bahan semakin lama, maka semakin banyak pula bahan mengikat larutan asam sehingga pH bahan semakin asam. Namun pH nanokalsium pada penelitian ini masih mendekati netral karena dilakukan proses penetralan dengan aquadest. Nilai pH serbuk nanokalsium tulang ikan bandeng ini masih mendekati pH netral. pH terendah pada penelitian ini yaitu 6,16 pada perlakuan perendaman 72 jam. Menurut Almatsier (2002), kalsium membutuhkan pH 6 agar berada dalam keadaan terlarut karena kalsium hanya bisa diabsorpsi bila terdapat dalam bentuk kalsium terlarut.

4.1.9 Kelarutan Kalsium

Pengujian kelarutan kalsium bertujuan untuk mengetahui kadar kalsium terlarut. Kandungan mineral dalam bahan pangan hanya salah satu parameter awal untuk menilai kualitas bahan pangan tersebut, karena yang lebih penting adalah bioavailabilitasnya. Mineral bersifat *bioavailable* apabila mineral tersebut dalam bentuk mineral terlarut, sehingga bentuk mineral terlarut diperlukan untuk memudahkan dalam penyerapan mineral tersebut di dalam tubuh (Santoso et al., 2008).

Hasil analisis ragam (Lampiran 39) kelarutan nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu perendaman memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kelarutan serbuk nanokalsium

yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 40) secara umum dapat dilihat pada Gambar 14.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 14. Grafik hubungan kelarutan kalsium dengan lama waktu perendaman yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 14 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 48 jam menghasilkan nilai kelarutan yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 24 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan perendaman 72 jam. Perlakuan perendaman 48 jam dan perendaman 72 jam memiliki nilai kelarutan kalsium yang tinggi dan relatif sama dibandingkan dengan kelarutan kalsium pada perlakuan perendaman 24 jam. Kelarutan pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam juga lebih tinggi dibandingkan dengan kelarutan pada sampel 0 jam. Tingginya kelarutan pada perlakuan perendaman 24 jam, 48 jam dan 72 jam ini berubungan dengan ukuran partikel suatu bahan, semakin kecil ukuran partikel maka tingkat kelarutan semakin tinggi. Hal ini dikarenakan pada perlakuan perendaman memiliki ukuran partikel yang kecil yaitu 55,757–396,1 nm (Lampiran 49) sedangkan pada kontrol (bubuk tulang ikan bandeng tanpa perlakuan perendaman) memiliki ukuran partikel yang lebih besar yaitu sekitar 342,0 - 615,1 nm (Lampiran 48).

Kelarutan kalsium pada penelitian ini lebih besar bila dibandingkan dengan kelarutan kalsium bubuk tulang ikan pada penelitian Trilaksani *et al.* (2006), yaitu sekitar 6,67%. Namun nilai kelarutan pada penelitian ini termasuk rendah, hal ini menunjukkan bahwa komponen mineral dalam bentuk bubuk tidak bisa diserap seluruhnya. Rendahnya kelarutan kalsium dalam bentuk bubuk ini mungkin terkait dengan metode pembuatan nanokalsium yaitu menggunakan metode presipitasi yang memiliki kelemahan dapat membentuk partikel berukuran mikro. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kent (2009) bahwa kelemahan metode presipitasi yaitu nanopartikel yang terbentuk harus distabilisasi untuk mencegah timbulnya kristal berukuran mikro yang dapat mempengaruhi laju kelarutan suatu bahan.

Kelarutan kalsium juga berhubungan dengan pH suatu bahan. Kalsium membutuhkan pH 6 agar berada dalam keadaan terlarut (Almatsier, 2002). Perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam memiliki pH mendekati 6 yaitu 6,38 dan 6,16. Kondisi ini sejalan dengan penelitian Santoso *et al.* (2006), bahwa kelarutan kalsium tertinggi terjadi pada suasana asam dan akan menurun sejalan dengan peningkatan nilai pH demikian pula persen penyerapannya. pH asam akan meningkatkan kelarutan kalsium dan absorpsinya didalam usus halus.

4.1.10 Distribusi Ukuran Partikel

Pengukuran partikel nano pada penelitian ini menggunakan instrument *partile size analyzer* (PSA). Pengukuran ini dilakukan terhadap sampel sebelum diberi perlakuan (sebelum proses perendaman dengan HCl) dan setelah perlakuan. Pengukuran partikel sebelum perlakuan ini dilakukan pada sampel kontrol (bubuk tulang ikan bandeng) yang telah diayak dengan ayakan 100 *mesh*. Sampel yang telah diayak ini diperoleh hasil pengukuran seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Distribusi ukuran partikel sampel kontrol (serbuk tulang ikan bandeng)

Ukuran partikel (nm)	Persentase	Range ukuran partikel (nm)
342,0	14,8%	342,0 - 615,1
396,1	31,8%	
458,7	33,6%	
531,2	18,4%	
615,1	1,4%	

Hasil analisa tersebut terlihat bahwa pengukuran sampel kontrol (sebelum diberi perlakuan) menunjukkan hasil ukuran partikel 342,0 – 615,1 nm (Lampiran 41). Hasil pengukuran pada kontrol ini dijadikan sebagai pembandingan dengan sampel setelah perlakuan perendaman yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Distribusi ukuran partikel nanokalsium masing-masing perlakuan

Perlakuan	Ukuran partikel (nm)	Persentase (%)	Rata-rata ukuran partikel (nm)
24 jam	68,06	0,1	68,06 – 396,1
	78,82	9,7	
	91,28	7,6	
	105,7	8,5	
	122,4	6,0	
	141,8	2,2	
	220,2	3,4	
	255,0	10,4	
	295,3	17,3	
	342,0	19,5	
	396,1	15,0	
48 jam	58,77	1,4	58,77 – 342,0
	68,06	4,2	
	78,82	5,2	
	91,28	3,5	
	105,7	1,9	
	190,1	8,1	
	220,2	18,0	
	255,0	24,2	
	295,3	21,6	
	342,0	11,8	
	72 jam	58,77	
68,06		4,9	
78,82		4,1	
91,28		1,5	
164,2		0,3	
190,1		7,1	
220,2		17,8	
255,0		25,0	
295,3		22,8	
342,0		12,1	
396,1	1,4		

Hasil analisa pada sampel yang diberi perlakuan perendaman 24 jam, 48 jam dan 2 jam terlihat bahwa ukuran partikel lebih kecil dibandingkan dengan sampel sebelum diberi perlakuan. Sampel yang diberi perlakuan perendaman 24 jam menghasilkan ukuran 68,06 – 396,1 nm (Lampiran 43), sampel pada perlakuan perendaman 48 jam menghasilkan ukuran 58,77 – 342,0 nm (Lampiran 44), sedangkan sampel pada perlakuan perendaman 72 jam menghasilkan ukuran yang lebih kecil yaitu 58,77 – 396,1 nm (Lampiran 45). Hasil pengukuran ini jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan sampel sebelum diberi perlakuan. Hal ini dikarenakan pembuatan kalsium dengan ukuran nano dibuat dengan metode presipitasi. Proses presipitasi menggunakan larutan HCl mengakibatkan terbentuknya partikel-partikel putih halus yang tidak larut dan membentuk suatu suspensi. Keadaan tersebut merupakan suatu keadaan koloid. Partikel-partikel koloid mengandung beberapa ribu atom, ion atau molekul kecil (Keenan *et al.* 1980). Pernyataan ini didukung oleh Haskell (2005), bahwa metode presipitasi dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan di dalam larutan melalui perubahan pH, suhu, atau pelarut. Endapan yang dihasilkan dari kondisi yang sangat jenuh ini memiliki banyak partikel berukuran kecil. Kelebihan metode ini adalah dapat menghasilkan partikel lebih kecil dari 100 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Suptijah *et al.* (2012), yang berhasil membuat serbuk nanokalsium dengan metode presipitasi menggunakan larutan asam dan menunjukkan ukuran partikel berkisar antara 37-127 nm.

Ukuran partikel pada penelitian ini masih termasuk partikel yang berukuran nano. Pernyataan ini didukung oleh Mohanraj dan Chen (2006), bahwa nanopartikel didefinisikan sebagai partikel yang berukuran kisaran 10-1000 nm. Ditambahkan juga oleh Poole and Owens (2003), nanopartikel adalah partikel berukuran antara 1-1000 nm. Hal ini berarti nanokalsium tulang ikan bandeng yang dihasilkan memiliki ukuran partikel nano.

4.1.11 Spektra Infra Merah Nanokalsium

Fourier Transform Infra Red (FTIR) merupakan teknik spektroskopi inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus kompleks dalam senyawa, namun tidak dapat mengidentifikasi unsur-unsur penyusunnya. Spektroskopi inframerah memanfaatkan energi vibrasi dari gugus penyusun senyawa hidroksiapatit yakni gugus PO_4^{3-} , gugus CO_3^{2-} dan gugus OH^- . Analisis FTIR dilakukan pada range $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (Dahlan *et al.*, 2006).

Ada dua jenis energi vibrasi yaitu vibrasi bending dan vibrasi stretching. Menurut Pallela *et al.* (2011), vibrasi bending yaitu pergerakan atom yang menyebabkan perubahan sudut ikatan antara dua ikatan atom atau pergerakan dari seluruh atom terhadap atom lainnya. Sedangkan vibrasi stretching adalah pergerakan atom yang teratur sepanjang sumbu ikatan antara dua atom sehingga jarak antara dua atom dapat bertambah atau berkurang. Gugus PO_4^{3-} memiliki 4 modus vibrasi yaitu, vibrasi stretching simetri (ν_1) dengan bilangan gelombang sekitar 956 cm^{-1} , vibrasi bending simetri (ν_2) dengan bilangan gelombang sekitar $430\text{-}474\text{ cm}^{-1}$, vibrasi stretching asimetri (ν_3) dengan bilangan gelombang sekitar $1030\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ dan vibrasi bending asimetri (ν_4) dengan bilangan gelombang sekitar $575\text{-}610\text{ cm}^{-1}$.

Gugus karbonat (CO_3^{2-}) berdasarkan lokasinya terdiri dari dua tipe yaitu apatit karbonat tipe A dan apatit karbonat tipe B. Apatit karbonat tipe A terbentuk jika karbonat menggantikan posisi OH^- , sedangkan apatit karbonat tipe B terbentuk jika karbonat menggantikan posisi PO_4^{3-} (Mathai dan Takagi, 2001). Spektra FTIR menunjukkan terbentuk gugus fosfat (PO_4^{3-}), apatit karbonat (CO_3^{2-}) dan hidroksil (OH^-) yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil spektra FTIR kontrol dan nanokalsium tulang ikan bandeng

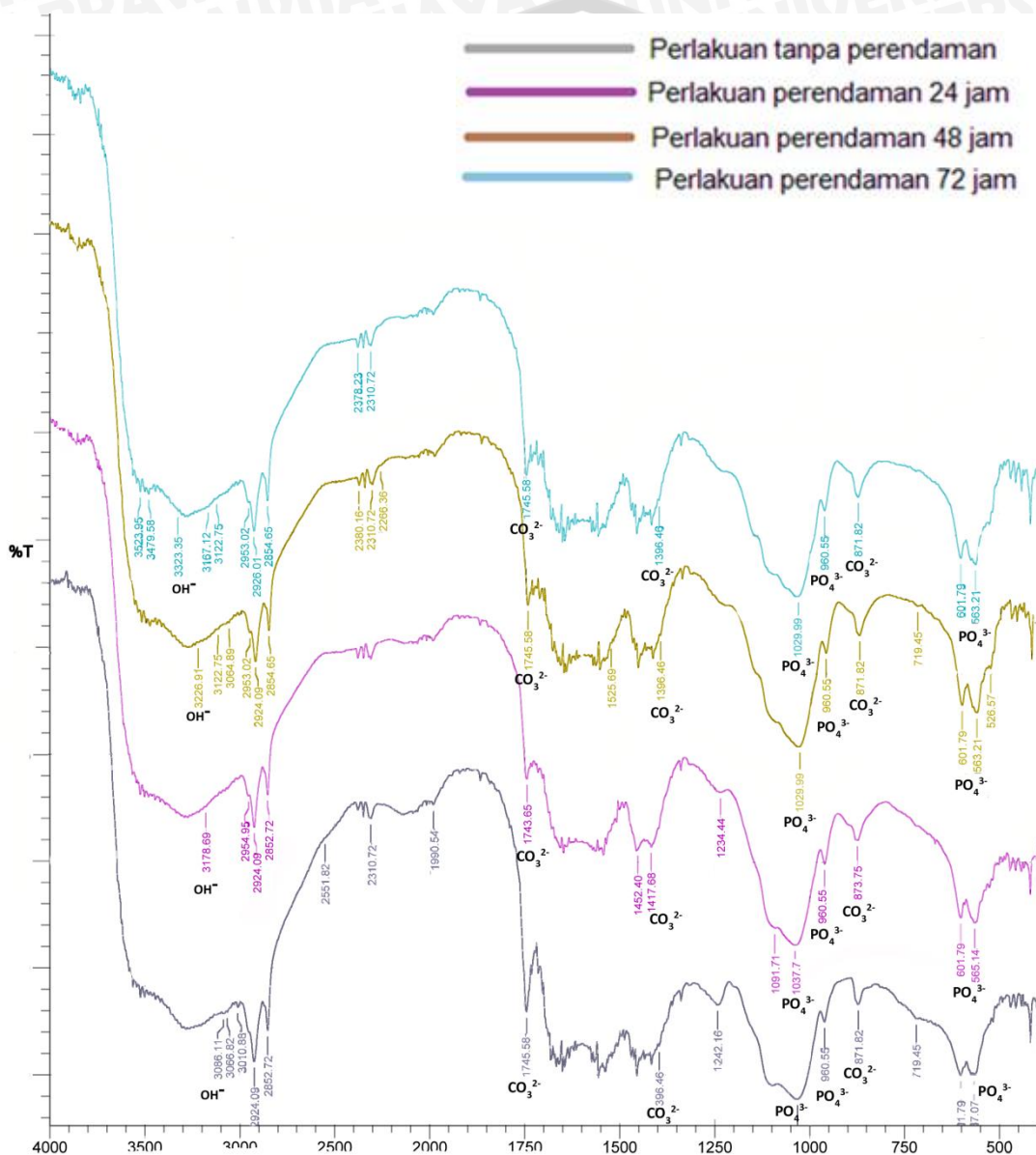
Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Panjang gelombang (cm ⁻¹)				
		Standard Nanokalsium tulang ikan*	BB	NK24	NK48	NK72
400-1100	v ₁ PO ₄ ³⁻	959	960	960	960	960
	v ₂ PO ₄ ³⁻	474	-	-	-	-
	v ₃ PO ₄ ³⁻	1031	1031	1037	1029	1029
	v ₄ PO ₄ ³⁻	562	567	565	563	563
1745	CO ₃ ²⁻ tipe A	603	601	601	601	601
875-1400	CO ₃ ²⁻ tipe B	1745	1745	1743	1745	1745
		873	871	873	871	871
3100-3600		1415	1396	1396	1396	1396
	OH	3570	3086	3178	3226	3523

*Lekahena *et al.*, (2011)

Spektra FTIR yang terbentuk pada sampel BB (bahan baku), NK24 (nanokalsium perendaman 24 jam), NK48 (nanokalsium perendaman 48 jam) dan NK72 (nanokalsium perendaman 72 jam) seperti terlihat pada Gambar 15 dalam jangkauan bilangan gelombang 400-4000 cm⁻¹. Berdasarkan spektra FTIR pita absorpsi gugus PO₄³⁻ pada semua sampel berada pada bilangan gelombang 960 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi stretching simetri (v₁), sedangkan vibrasi bending simetri (v₂) tidak terdeteksi pada semua sampel. Pita absorpsi PO₄³⁻ vibrasi stretching asimetri (v₃) pada spektra sampel BB dan NK24 terdapat pada bilangan gelombang 1031 dan 1037 cm⁻¹, sedangkan sampel NK48 dan NK72 terbentuk disekitar 1029 cm⁻¹. Pita absorpsi PO₄³⁻ vibrasi bending asimetri (v₄) ditandai pita absorpsi dalam bentuk belah didaerah 567cm⁻¹ dan 565cm⁻¹ pada sampel BB dan NK24, didaerah 563cm⁻¹ pada sampel NK48 dan NK72 serta didaerah 601 cm⁻¹ pada semua sampel.

Pita absorpsi gugus CO₃²⁻ terdeteksi pada dua lokasi yaitu pada daerah sekitar 1745cm⁻¹ yang mencirikan apatit karbonat tipe A. Lokasi kedua yaitu pada daerah 871 cm⁻¹, 873 cm⁻¹ dan 1396 cm⁻¹ yang mencirikan apatit karbonat tipe B. Hal ini sesuai dengan penelitian Boutinguiza *et al.* (2012), yang mendeteksi gugus CO₃²⁻ pada daerah sekitar 875 cm⁻¹ sedangkan pada penelitian Dahlan *et*

al.(2006), gugus fungsi senyawa CO_3^{2-} terdeteksi pada bilangan gelombang 1400 cm^{-1} . Gugus hidroksil (OH) terdeteksi pada bilangan gelombang 3086 cm^{-1} - 3523 cm^{-1} . Hal ini memiliki kemiripan pada penelitian Huang *et al.* (2011) yaitu gugus OH terdeteksi pada 3100-3600 cm^{-1} .



Gambar 15. Spektra FTIR nanokalsium dengan perbedaan lama waktu perendaman

Pita absorbs spektra FTIR pada peneitian ini memiliki kemiripan dengan hasil penelitian Boutinguizaet *al.* (2012), dimana karakteristik spektra bubuk *fish hydroxyapatite* dari tulang ikan menunjukkan gugus fosfat (PO_4^{3-}) terdeteksi

didaerah 571 cm^{-1} , 603 cm^{-1} , 962 cm^{-1} dan 1031 cm^{-1} , sementara gugus apatit karbonat (CO_3^{2-}) terdeteksi pada 875 cm^{-1} dan $1384\text{ cm}^{-1} - 1745\text{ cm}^{-1}$. Hal ini menjelaskan bahwa sampel nanokalsium merupakan hidroksiapatit.

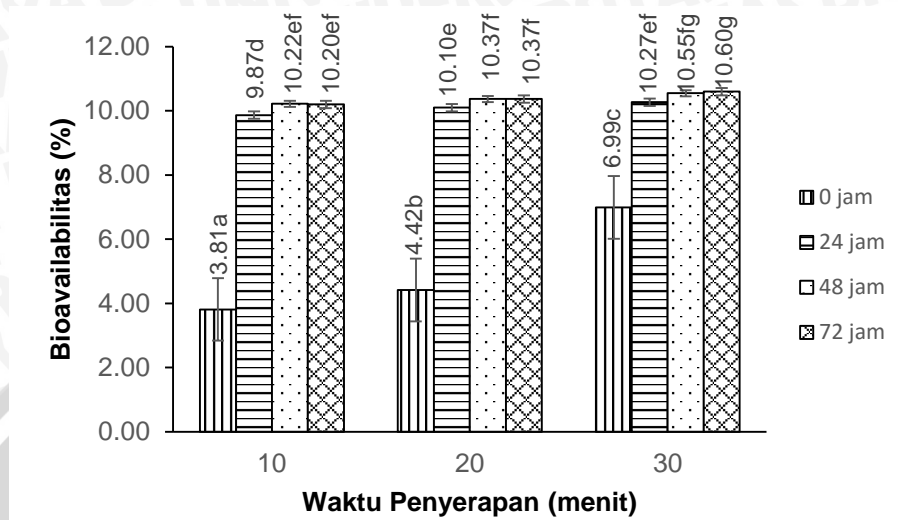
Hidroksiapatit termasuk di dalam keluarga senyawa kalsium fosfat yang mempunyai rumus molekul $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Material Hidroksiapatit berasal dari sumber alami yang dapat membentuk ikatan yang kuat dengan jaringan tulang (Boutinguiza *et al.*, 2012). Ditambahkan oleh Huang *et al.* (2011), bahwa hidroksiapatit merupakan komponen anorganik dalam tulang dan gigi. Menurut Almsier (2001), hidroksiapatit merupakan suatu struktur kristal yang terdiri atas kalsium fosfat dan disusun disekeliling matriks organik berupa protein kolagen untuk memberikan kekuatan dan kekakuan tulang.

4.2 Bioavailabilitas *In Vitro* Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Kadar abu merupakan indikator utama kandungan mineral pada bubuk nanokalsium tulang ikan bandeng. Bubuk nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan nilai kadar abu yang tinggi juga memiliki kandungan kalsium yang tinggi pula. Namun yang lebih penting adalah kandungan kalsium tersebut available untuk dapat diserap oleh tubuh atau tidak. Penyerapan kalsium tidak hanya tergantung pada kadar kalsium tetapi juga pada kelarutan dan ketersediaan untuk diserap. Bioavailabilitaskalsium dapat didefinisikan sebagai fraksi kalsium yang berpotensi diserap oleh usus dan dapat digunakan untuk fungsi-fungsi fisiologis, terutama mineralisasi tulang, atau mengurangi pengeroposan tulang (Gueguen *et al.*, 2000).

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 46) bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng menunjukkan bahwa perlakuan lamanya waktu penyerapan memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan bioavailabilitas

nanokalsium yang dihasilkan. Hasil uji lanjut dengan BNT (Lampiran 48) secara umum dapat dilihat pada Gambar 16.

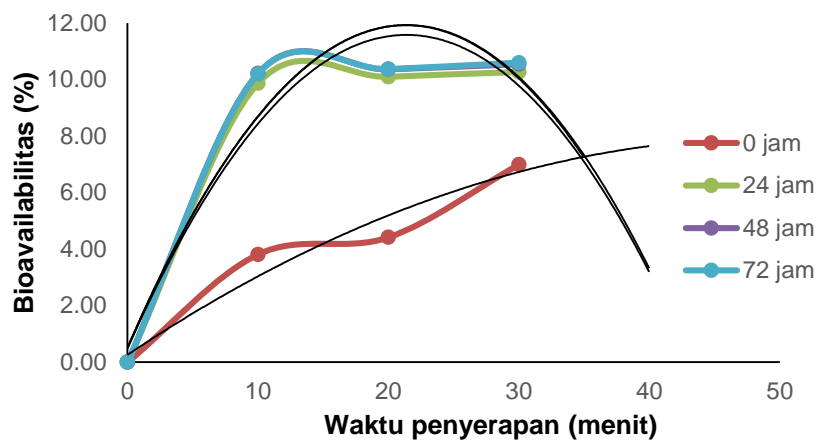


Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 16. Grafik hubungan bioavailabilitas nanokalsium dengan lama waktu penyerapan yang berbeda

Grafik histogram pada Gambar 16 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman 24 jam, 48 jam dan 72 jam memiliki nilai bioavailabilitas yang berbeda nyata. Perlakuan perendaman ini juga berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol (0 jam). Pada sampel kontrol dengan waktu penyerapan 10 menit nilai bioavailabilitasnya sebesar 3,81% sedangkan pada perlakuan perendaman 24 jam dengan waktu penyerapan 10 menit nilai bioavailabilitas sebesar 9,87%. Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan bioavailabilitas setelah dilakukan perlakuan perendaman, peningkatan ini sebesar 61,39%. Begitu pula dengan perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam yang tidak berbeda nyata, pada waktu penyerapan 10 menit nilai bioavailabilitas mengalami peningkatan sebesar 62,72%. Semakin lama waktu penyerapan nilai bioavailabilitasnya juga semakin tinggi namun pada perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam nilai bioavailabilitasnya tidak berbeda nyata dan lebih tinggi dibandingkan dengan

perlakuan perendamn 24 jam. Hal ini dapat dilihat pada grafik regresi bioavailabilitas Gambar 17.



Gambar 17. Grafik regresi kuadratik bioavailabilitas nanokalsium dengan lama waktu penyerapan yang berbeda

Pada Gambar 17 dapat dilihat hasil regresi bioavailabilitas masing-masing perlakuan, jika waktu penyerapan dilanjutkan melebihi 30 menit maka diduga bioavailabilitas nanokalsium akan mengalami penurunan. Hal ini karena kalsium dapat terserap hampir sempurna dalam waktu 10 sampai 20 menit (Justiani, 2008). Pada penelitian Suptijah (2012), tentang nanokalsium cangkang udang disebutkan juga bahwa pada waktu penyerapan 7 menit kalsium dapat terserap sebesar 63,3%.

Namun nilai bioavailabilitas pada penelitian ini masih sangat kecil. Berdasarkan data dari Guthrie (1975), bioavailabilitas nanokalsium termasuk kategori hampir sangat buruk, karena masih berada diantara penyerapan tidak optimum yaitu 10 %. Level penyerapan optimum menurut Guthrie (1975) adalah sebesar 40 %, sedangkan kategori cukup baik jika level penyerapan kalsium dalam tubuh mencapai 20-30 %. Bioavailabilitas nanokalsium pada penelitian ini juga lebih rendah bila dibandingkan dengan bioavailabilitas penelitian Erfanian *et al.* (2014) sebesar 30,17% pada serbuk nanokalsium yang difortiikasikan

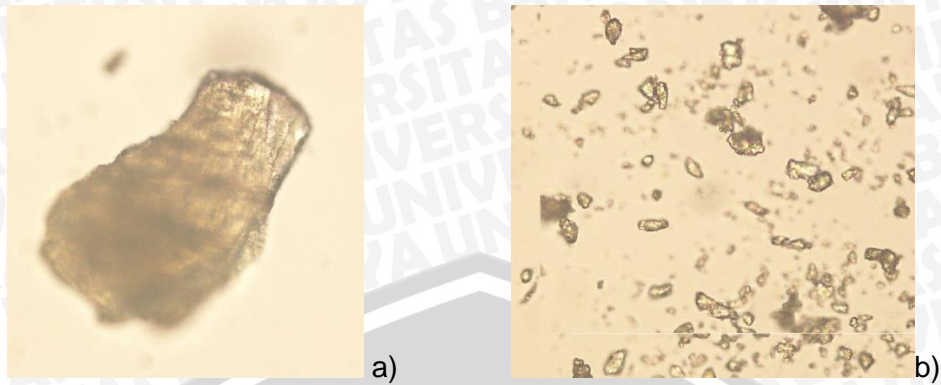
pada susu bubuk dan diterapkan pada tikus osteoporosis. Rendahnya bioavailabilitas nanokalsium pada penelitian ini dipengaruhi oleh keterbatasan metode *in vitro* yang tidak dapat memperhitungkan faktor fisiologis dalam tubuh (seperti enzim, status kalsium tubuh, hormon dan lain sebagainya). Menurut Puspita (2003), adanya interaksi kompleks antara mineral dan komponen lain didalam makanan menyebabkan keseimbangan mineral susah dipelajari dengan metode *in vitro*. Faktor lain yang mempengaruhi rendahnya nilai bioavailabilitas pada penelitian ini menjelaskan bahwa serbuk nanokalsium kurang optimal dengan pemanfaatan secara langsung. Penggunaan nanokalsium tulang ikan bandeng diduga akan menghasilkan penyerapan kalsium yang lebih besar, jika difortifikasi ke dalam bahan pangan lain ataupun susu. Parket *al.* (2007), bahwa konsumsi nanokalsium (30-900 nm) yang diperkaya susu dapat mencegah keropos tulang karena ukuran partikel dapat mempengaruhi kelarutannya.

Nilai bioavailabilitas pada perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam lebih tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan perendaman 24 jam, ini dipengaruhi oleh beberapa faktor. Pada perlakuan perendaman 48 dan 72 jam kadar kalsium lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan perendaman 24 jam (Gambar 9). Hal ini menyebabkan penyerapan kalsium pada perlakuan perendaman 24 jam lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam, karena semakin tinggi kadar kalsium maka semakin tinggi pula penyerapannya.

Nilai pH dan kelarutan juga mempengaruhi bioavailabilitas kalsium. Pada perlakuan perendaman 24 jam nilai pH lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam (Gambar 13) kondisi ini dapat mempengaruhi bioavailabilitas kalsium. Orias (2008), menyatakan bahwa pH dapat berpengaruh terhadap proses absorpsi kalsium. Kalsium akan sulit diserap pada pH diatas 6,5 dan baik diserap pada pH 6,0. Pada perlakuan

perendaman 24 jam pH mencapai angka 6,58 sehingga tingkat penyerapan kalsium lebih rendah dibandingkan dengan penyerapan kalsium pada perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam yang memiliki nilai pH lebih kecil. Kelarutan juga merupakan salah satu syarat dalam penyerapan kalsium. Pada perlakuan perendaman 24 jam memiliki nilai kelarutan yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan perendaman 48 jam dan 72 jam. Menurut Allen dan Wood (1994) kelarutan kalsium meningkat dalam lingkungan asam pada perut tetapi ion terlarut akan bergabung kembali kemudian berpresipitasi dalam jejunum dan ileum dimana pHnya mendekati netral. Peningkatan penyerapan mineral terjadi pada suasana asam dan akan menurun sejalan dengan kenaikan pH dan sebaliknya.

Tingginya nilai bioavailabilitas nanokalsium pada perlakuan perendaman 24 jam, 48 jam dan 72 jam dibandingkan dengan sampel kontrol (sebelum perlakuan) dipengaruhi oleh ukuran partikel sampel. Sebelum perlakuan ukuran partikel berkisar antara 342,0 - 615,1 nm, sedangkan sesudah perlakuan perendaman 24 jam, 48 jam dan 72 jam ukuran partikel lebih kecil yaitu berkisar antara 58,77 – 396,1 nm (Lampiran 44 dan 45). Perbedaan ukuran partikel pada sampel sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan ini dapat dilihat pada Gambar 18 yaitu menunjukkan gambar ukuran partikel yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pada gambar terlihat bahwa ukuran partikel sebelum perlakuan memiliki struktur yang menggumpal dan lebih besar, sedangkan pada sampel sesudah perlakuan perendaman terlihat bahwa struktur lebih kecil. Menurut Mohanraj dan Chen (2006), bahwa ukuran partikel merupakan karakteristik terpenting dalam penentuan distribusi partikel secara *in vivo* serta mempengaruhi sistem kelarutan dan stabilitasnya.



Gambar 18. Ukuran partikel a). sebelum perlakuan(kontrol); b). sesudah perlakuan perendaman

Nilai bioavailabilitas nanokalsium pada penelitian ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan bioavailabilitas kontrol(bahan baku bubuk tulang ikan bandeng sebelum perlakuan) serta jauh lebih tinggi pula bila dibandingkan dengan tepung tulang ikan tuna pada penelitian Nabil (2005), yaitu sebesar 0,86%. Hal ini dikarenakan partikel berukuran nano pada bubuk nanokalsium dapat meningkatkan penyerapan kalsium. Pernyataan ini didukung oleh Erfanian *et al.* (2014), bahwa pengecilan ukuran partikel dianjurkan untuk meningkatkan penyerapan dan bioavailabilitas kalsium. Partikel menjadi lebih kecil sehingga luas permukaan terhadap volume meningkat. Ketika luas permukaan meningkat partikel larut lebih cepat karena terjadi hanya pada permukaan setiap partikel, sehingga meningkatkan tingkat penyerapan. Penelitian yang dilakukan Huang *et al.* (2007) juga menunjukkan bahwa ketersediaan kalsium lebih tinggi dengan ukuran nanokalsium dari pada mikrokalsium. Dijelaskan pula bahwa fortifikasi nanokalsium dapat meningkatkan kalsium tulang pada metabolisme tikus.

4.3 Analisis Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik dilakukan dengan menggunakan metode Indeks Efektifitas De Garmo. Pada penelitian ini penentuan perlakuan terbaik

digunakan untuk mengetahui waktu perendaman optimum untuk menghasilkan nanokalsium dengan sifat fisikokimia dan bioavailabilitas yang baik. Perlakuan dengan nilai hasil paling tinggi merupakan perlakuan terbaik. Hal ini karena nilai tersebut telah diperoleh dengan mempertimbangkan semua parameter yang berperan dalam menentukan mutu nanokalsium. Pembobotan didasarkan pada penilaian yang diberikan panelis.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan perendaman 72 jam. Penentuan perlakuan terbaik dengan metode De Garmo ini dapat dilihat pada Lampiran 51. Parameter yang digunakan dalam penentuan perlakuan terbaik meliputi rendemen, kadar air, kadar lemak, kadar protein, kadar abu, kadar kalsium, derajat putih, pH, Kelarutan kalsium dan bioavailabilitas nanokalsium.

Berdasarkan hasil perankingan parameter yang paling penting dalam menentukan mutu nanokalsium yaitu bioavailabilitas (Lampiran 47). Pada perlakuan perendaman 72 jam memiliki nilai bioavailabilitas yang tinggi dibandingkan perlakuan 24 jam dan 48 jam. Perlakuan perendaman 72 jam juga memiliki nilai kadar abu, kadar kalsium, derajat putih dan bioavailabilitas yang tinggi dibandingkan dua perlakuan lainnya. Tingginya nilai tersebut menunjukkan bahwa nanokalsium memiliki mutu yang baik pada perlakuan perendaman 72 jam. Hal ini didukung juga dengan data ukuran partikel pada perlakuan perendaman 72 jam yang memiliki ukuran partikel paling kecil yaitu 50,75-396,1 nm (Lampiran 45) dibandingkan perlakuan perendaman 24 jam dan 48 jam. Hasil spektra FTIR pada perlakuan 72 jam juga menunjukkan terbentuknya gugus fosfat (PO_4^{3-}), karbonat (CO_3^{2-}) dan hidroksil (OH^-) yang merupakan senyawa hidroksiapatit dan termasuk didalam keluarga kalsium fosfat. Berdasarkan keterangan tersebut diatas maka perlakuan perendaman 72 jam merupakan

perlakuan terbaik untuk menghasilkan nanokalsium dengan sifat fisikokimia dan bioavailabilitas yang baik.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Waktu perendaman optimum pada ekstraksi asam bubuk tulang ikan bandeng menggunakan larutan HCl 1 N yaitu selama 72 jam.
2. Karakteristik fisikokimia dan bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng terbaik yaitu rendemen sebesar 6,96%, kadar air 4,08%, kadar lemak 1,42%, kadar protein 4,80%, kadar abu 89,91%, kadar kalsium 40,94%, derajat putih 61,00; pH 6,16; kelarutan kalsium 11,42%, distribusi ukuran partikel 55,77-396,1 nm, analisis spektra FTIR nanokalsium terbentuk gugus fosfat PO_4^{3-} , karbonat CO_3^{2-} dan hidroksil (OH^-) yang membentuk hidroksiapatit. Bioavailabilitas terbaik pada menit ke 30 yaitu 10,60%.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari bioavailabilitas kalsium secara *in vivo* dengan hewan percobaan. Disarankan pula penggunaan nanokalsium tulang ikan bandeng dengan cara melakukan fortifikasi kedalam bahan makanan lain seperti biskuit, susu dan produk lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, L.H and Wood J.R. 1994. Calcium and Phospor, Modern Nutrition in Health and Diseases. *Journal of Nutrition*. Vol 1(8):119-126.
- Almatsier, S. 2002. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. PT. Gramedia PustakaUtama. Jakarta.
- Anggorodi, H.R. 1995. *Nutrisi Aneka Ternak Unggas*. PT.Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 24-26.
- Anugrah, P. 2010. Strategi Pengembangan Industri Kreatif Berbasis Limbah Industri Perikanan Sebagai Solusi Mengatasi Permasalahan Ekonomi dan Lingkungan Indonesia. *Karya Ilmiah*. IPB. Bogor. Hal 2.
- [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis the 16th ed*. Association of Official Analytical Chemists. Inc. Arlington. Washington DC.
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari N.L, Sedarwati dan Budiyanto S. 1989. *Analisis Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Astuti, M. 1989. *Uji Gizi Jilid 2*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta. Hal 17-20.
- Aviana, T. 2003. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Larutan Perendaman serta Metode Pengeringan Terhadap Sifat Fisik, Kimia dan Fungsional Gelatin dari Kulit Cucut. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol.11(1):101-107.
- Boutinguiza M, Pou J, Comesaña R, Lusquiños F, de Carlos A and León B. 2012. Biological Hydroxyapatite Obtained From Fish Bones. *J Materials Science and Engineering*. Vol.32(12):478-486.
- Bronner, F. 2008. Recent Developments in Intestinal Calcium Absorption. *Nutrition Review*. Vol.67(2):109-113.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 1992. SNI No. 01-3158-1992. Standar Mutu Tepung. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Dahlan, K., Sari Y.W, Yuniarti E dan Soejoko D.S. 2006. Karakterisasi Gugus Fosfat Dan Karbonat Dalam Tulang Tikus Dengan *Fourier Transform Infrared (Ft-Ir) Spectroscopy*. *Journal of Materials Science*. Vol.3(1):221 – 224.
- Dutta, J and Hofmann, H. 2005. Nanomaterials. Ebook: 37-39.
- Erfanian A, Mirhosseini H, Manap M.Y.A, Rasti B and Bejo M.H. 2014. Influence Of Nano-Size Reduction On Absorption And Bioavailability Of Calcium From Fortified Milk Powder In Rats. *J Food Research International*. Vol.66(20): 1-11.

- Eom, S.H, Kim J.A, Son B.Y, You D.H, Han J.M, Oh J.W, Kim B.Y and Kong C.S. 2013. Effects of Carrageenan on the Gelatinization of Salt-Based Surimi Gel. *Journal of Fish Aquat Sci*. Vol.16(3):143-147.
- Fardiaz D, Andarwulan N, Wijaya H dan Puspitasari L.N. 1992. *Petunjuk Laboratorium: Teknik Analisis Sifat Kimia dan Fungsional Komponen Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Fatimah, D. 2008. Efektivitas Penggunaan Asam Sitrat Dalam Pembuatan Gelatin tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos Forskal*) Kajian Variasi dan Konsentrasi Lama Perendaman. [Skripsi] Unpublished. Jurusan Kimia UIN. Malang.
- Gao H, Chen H, Chen W, Tao F, Zheng Y, Jiang Y and Ruan H. 2007. Effect of Nanometer Pearl Power on Calcium Absorption and Utilization in Rats. *Journal of Food Chemistry*. Vol. 3(109):493-498.
- Gedanken, A. 2004. Using Sonochemistry For The Fabrication Of Nanomaterials . *Journal Ultrasonic Sonochemistry*. Vol.1(11):47-55.
- Greiner, R. 2009. Current and Projected of Nanotechnology in the Food Sector. *Journal Nutrie of Brazilian Society of Food and Nutrition*. 34(1):243-260.
- Groff, J.L and Gropper, S.S. 1990. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Cengage Learning, Inc. Wadsworth.
- Guthrie, H.A. 1975. *Introductory Nutrition*. MosbyCompany. United State of America.
- Harland, F.B and Oberleas, D. 2001. *Effects of Dietary Fiber and Phytat on the Homeostatis and Bioavailability of Minerals*. Handbooks of Dietary Fiber in Human Nutrition. 3rd Edition. Library of Congress. New York.
- Haskell, R. 2005. *Nanotechnology for Drug Delivery*. Research Fellow Exploratory Formulation Pfizer, Inc. New York.
- Hemung, B.O. 2013. Properties of Tilapia Bone Powder and Its Calcium Bioavailability Based on Transglutaminase Assay. *International Journal Biosci, Biochem and Bioinform*. Vol.3(3):306-309.
- Huang Y.C, Hsiao P.C and Chai H.J. 2011. Hydroxyapatite Extracted From Fish Scale: Effects On MG63 Osteoblast-Like Cells. *J Ceramics International*. Vol.37(11):1825–1831.
- Judprasong, K., Atitaya, S and Juwadee, S. 2007. A Continous-Flow Dialysis System Hyphenated with Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry for *in vitro* Estimation of Mineral Bioaccessibility. Mahidol University Press. Bangkok.
- Keenan C.W, Kleinfelter D.C and Wood J.H. 1980. *Kimia untuk Universitas Edisi keenam*. Terjemahan *General College Chemistry (Sixth Edition)*. Pudjaatmaka AH, penerjemah. Erlangga. Jakarta.

- Kenth, S. 2009. *Investigation of Femtosecond Laser Technology for the Fabrication of Drug Nanocrystals in Suspension*. Sciences Pharmaceutiques, Université de Montréal. Montreal.
- Khoerunnisa. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Nano Kalsium dari Cangkang Kijing Lokal (*Pilsbryococha exilis*) dengan Metode Presipitasi. [Skripsi] Unpublished. Jurusan Teknologi Hasil Perikanan FPIK. IPB. Bogor.
- Kurniawati, Y.R. 2014. Pengaruh Asam Sitrat dan Fitase *Bacillus Subtilis* Hg Pada Jagung (*Zea mays*) Terhadap Bioavailabilitas mineral ca (*In-Vitro*). [Skripsi] Unpublished. FMIPA UNESA. Surabaya.
- Lanimarta, Y. 2012. Pembuatan dan Uji Penetrasi Nanopartikel Kurkumin-Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4 Dalam Sediaan Gel Dengan Menggunakan Sel Difusi Franz. [Skripsi] Unpublish. Fakultas MIPA, Program Studi Farmasi, UI. Jakarta
- Lekahena, V, Faridah, D.N, Syarief, R., dan Peranginangin, R. 2014. Karakterisasi Fisikokimia Nanokalsium Hasil Ekstraksi Tulang Ikan Nila Menggunakan Larutan Basa dan Asam. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol.1(25):57-64.
- Mahmoud N.S, Ghaly A.E and Arab F. 2007. Unconventional Approach For Demineralization Of Deproteinized Crustacean Shells For Chitin Production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Vol.3(1): 1-9.
- Mathai M and Takagi S. 2001. Structures o Biological Minerals in Dental Research. *J Res Nat o Ins Stand Technol*. Vol.106(37):1035-1044.
- Maulida. 2005. Pemanfaatan Tepung Tulang Madidihang Sebagai Suplemen dalam Pembuatan Biskuit (*Crackers*). [Skripsi] Unpublished. Jurusan Teknologi Hasil Perikanan FPIK. IPB. Bogor.
- Mc Dowell, L.R. 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Academic Press Inc. San Diego.
- Mohanraj, V.J and Chen Y. 2006. Nanoparticle A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol.5(1):561-573.
- Muchtadi, D., Palupi, N.S dan Astawan, M. 1993. *Metabolisme Zat Gizi Sumber, Fungsi, dan Kebutuhan Bagi Tubuh Manusia Jilid II*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Mulyani T, Sudaryati dan Rahmawati S,F. 2004. Hidrolisis Gelatin Tulang Ikan Kakap Menggunakan Larutan Asam. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol.13(1):81-86.
- Nabil, M. 2005. Pemanfaatan Limbah Tulang Ikan tuna(*Thunus sp.*) Sebagai Sumber Kalsium Dengan Metode Hidrolisis Protein. [Skripsi] Unpublish. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Bogor.
- Nieves. 2005. Osteoporosis: The Role of Micronutrients. *Journal Clin Nutrition*. Vol.3(81):1232-1239.

- O'dell, B.L. 1997. *Mineral Ion Interaction as Assessed by Bioavailability and Ion Channel Funtion*, Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Marcell Dekker. Ne York.
- Orias, A. 2008. Pemanfaatan Tepung Tulang Ikan Patin (Pangianus Sp) Sebagai Sumber Kalsium Dan Fosfor Dalam Pembuatan Biskuit. [Thesis] Unpublish. Pascasarjana IPB, Bogor.
- Pallela R, Venkatesan J and Kim, S.K. 2011. Polymer Assisted Isolation Of Hydroxyapatite From Thunnus Obesus Bone. *J Ceramics International*. Vol.37(2):3489–3497.
- Palupi, N. S., Zakaria, F.R dan Prangdimurti, E. 2007. *Evaluasi Nilai Biologis Vitamin dan Mineral*. IPB Press. Bogor.
- Park, H.S., Jeon, B.J., Ahn, J and Kwak, H.S. 2007. Effects of Nanocalcium Supplemented Milk on Bone Calcium Metabolism in Ovariectomized Rats. *Journal Animal ScienceAsian – Australia*. Vol. 20 (8):1266-1271.
- Percival, M. 1999. Bone Health and Osteoporosis. *Applied Nutritional Science Reports*. Vol.4(5).
- Poole, C.P and Owens, F.J. 2003. *Introduction to Nanotechnology*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Puspita, I.D. 2003. *Bioavailabilitas Kalsium Secara in-vitro pada Susu Bubuk yang Diberi Klaim High Calsium dengan Penambahan Serat dan Tanpa Penambahan Serat yang Beredar di Pasaran*. IPB Press. Bogor.
- Ramsden, J.J. 2009. *Nanoteknologi Terapan: Konversi dari Hasil Penelitian Menjadi Produk*. Penerbit Erlangga. Jakarta. Hal 11-12.
- Rifai, A.M, Nontji A, Eridodo, Jalal f, Fardiaz D dan Fallah T.S. 2004. *Risalah Widya Karya Pangan dan Gizi V*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi. Jakarta. Hlm 877.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan, Jilid I-II. Edisi II*. Bina Cipta: Bogor. Hal 29.
- Santoso, J., Nurjanah dan Irawan, A. 2008. Kandungan dan Kelarutan Mineral Pada Cumi-cumi (*Loligo sp*) dan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmuilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*. Vol. 15(1):7-12.
- Sari, M. 2011. Identifikasi Protein Menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR). [Skripsi] Unpublished. Fakultas Teknik, Program Teknik Kimia, UI. Jakarta.
- Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis*. Penerbit Kanisus. Yogyakarta. Hal 24-25.
- Sediaoetama, A.D. 2000. *Ilmu Gizi untuk Mahasiswa dan Profesi di Indonesia*. Dian Rakyat. Jakarta.

- Sittikulwitit, S., Sirichakwal, P.P, Puastien, P., Chavasit, V dan Sungpuag, P. 2004. In Vitro Bioavailability of Calcium from Chicken Bone Extracts Powder and Its Fortified Products. *Journal Food Compos Analisis*. Vol.2(17):321-329.
- Suarsana, N., I Dharmawan, I., Gorda, B dan Pontjo, P. 2011. Tepung Tempe Kaya Isoflavon Meningkatkan Kadar Kalsium, Posfor dan Estrogen Plasma Tikus Betina Normal. *Jurnal Veteriner* . Vol.12(3): 229-234.
- Sudarmaji. 2012. Mempelajari Pengaruh Jenis Inisiator, Jenis Surfaktan dan waktu Feeding Monomer Terhadap Kinerja Pressure Sensitive Adhesive Berbasis Air. [Tesis] *Unpublished*. Jurusan Ilmu Material FMIPA. UI. Jakarta.
- Suptijah, P., Jacob, A.M dan Deviyanti, M. 2012. Karakterisasi dan Bioavailabilitas Nanokalsium Cangkang Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Akuatika*. Vol. 3(1):63-73.
- Suryandari S. 1981. Pengambilan Oleoresin Jahe dengan Cara Solvent Extraction. BPIHP. Bogor.
- Suzuki, T., Clydesdale, F.M and Pandolf, T. 1992. Solubility of Iron in Model Containing Organic Acid and Lignin. *Journal of Food Protection*. Vol. 3(55):893-898.
- Thalib, A. 2009 Pemanfaatan Tepung Tulang Madidihang (*Thunnus albacore*) Sebagai Sumber Kalsium dan Fosfor Untuk Meningkatkan Nilai Gizi Makronutrien. [Thesis] *Unpublished*. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Tohopi F.A., Ali K dan Karim N. 2013. Pengaruh Penerapan Pendekatan Pembelajaran Kontekstual (CTL) Terhadap Kemampuan Koneksi Matematik Siswa Kelas XI SMA Terpadu Wira Bhakti Pada Pokok Bahasan Turunan. Artikel Ilmiah. Fakultas MIPA, Universitas Gorontalo. Gorontalo. Hal 12.
- Tongchan, P., Prutipanlai, S., Niyomwas, S and Thongraung, S. 2009. Effect Of Calcium Compound Obtained From Fish by Product on Calcium Metabolism In Rats. *J. Food, Ag-Ind*. Vol.2(04):669-676.
- Trilaksani, W., Salamah, E., dan Nabil, M. 2006. Pemanfaatan Limbah Tulang Ikan Tuna (*Thunnus sp.*) Sebagai Sumber Kalsium dengan Metode Hidrolisis Protein. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. Vol.9(2):34-45.
- Udendi, E.A., Arisa, N.U, and Ikpa, E. 2009. Effects of Soaking and Boiling and Autoclaving on The Nutritional Quality of *Mucuna flagellipes* ("ukpo"). *African. Journal of Biochemistry Research*. Vol.4(2):47-50.
- Vatria, B. 2010. Pengolahan Ikan Bandeng (*Chanos-Chanos Forskal*) Tanpa Duri. *Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Rekayasa*. Vol. 2(1):18-24.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Analisis Perhitungan Rendemen

Prosedur analisis perhitungan rendemen adalah sebagai berikut :

1. Timbang berat bahan baku tulang ikan bandeng (a)
2. Timbang berat bubuk nanokalsium (b)

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = berat awal sampel (g)

B = berat akhir sampel (g)

Lampiran 2. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Air

Prinsip penentuan kadar air adalah menguapkan kadar air dalam bahan dengan jalan pemanasan, kemudian menimbang bahan sampai berat konstan.

Prosedur penentuan kadar air adalah sebagai berikut :

1. Botol timbang dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang
2. Sampel ditimbang sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya
3. Botol timbang yang telah berisi sampel tersebut kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 105 °C selama 5 jam sampai berat konstan
4. Botol timbang dan sampel tersebut kemudian dikeluarkan dari oven dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15-30 menit dan ditimbang.
5. Kehilangan berat tersebut dihitung sebagai presentase kadar air.

Presentase kadar air berdasarkan berat basah (Wb) dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A + B) - (C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

- A = berat botol timbang (g)
- B = berat sampel (g)
- C = berat akhir (botol timbang + sampel) (g)

Lampiran 3. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Lemak

Prosedur penentuan kadar lemak berdasarkan metode ekstraksi soxhlet adalah sebagai berikut :

1. Labu lemak dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang beratnya.
2. Sampel sebanyak 1 g dalam bentuk tepung dibungkus dalam kertas saring dan diletakkan dalam alat ekstraksi soxhlet, kemudian dipasang alat kondensor diatasnya dan labu lemak dibawanya.
3. Dituangkan pelarut PE (petroleum eter) kedalam labu lemak secukupnya dan dilakukan refluks selama 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke dalam labu lemak berwarna jernih.
4. Pelarut yang ada dalam labu lemak didestilasi, dan pelarut ditampung kembali. Kemudian labu lemak berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama ±5 jam hingga mencapai berat tetap, kemudian didinginkan dalam desikator.
5. Selanjutnya labu beserta lemak didalamnya ditimbang dan kadar lemak sampel dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(B - A)}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

- A = berat labu lemak (g)
- B = berat labu lemak beserta lemak (g)
- C = berat sampel (g)

Lampiran 4. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Abu

Prosedur penentuan kadar abu adalah sebagai berikut:

1. Kurs porselin kosong dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit.
2. Sampel ditimbang sebanyak 1 g dan diletakkan dalam kurs porselin, kemudian dibakar dalam kompor listrik sampai tidak berasap.
3. Sampel beserta kurs porselin kemudian dimasukkan ke dalam tanur pengabuan (*muffle*). Pengabuan dilakukan pada suhu 600 °C selama 5 jam hingga sampel menjadi abu yang ditandai dengan warna putih atau kelabu.
4. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang berat akhir. Presentase kadar abu dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{(C - A)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat kurs porselin (g)

B = berat sampel (g)

C = berat akhir (g)

Lampiran 5. Prosedur Analisis Perhitungan Kadar Protein

Prosedur penentuan kadar protein adalah sebagai berikut:

1. Sampel sebanyak 0,5 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, kemudian ditambahkan 0,25 g tablet kjeldahl dan 3 ml H₂SO₄ pekat 95%
2. Sampel selanjutnya dilakukan destruksi (pemanasan dalam keadaan mendidih) selama 1 jam, sampai larutan jernih kemudian didinginkan
3. Isi labu dituangkan ke dalam alat destilasi, labu dibilas 5-6 kali dengan aquades sampai 20 ml
4. Air bilasan dimasukkan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan larutan NaOH 40 % sebanyak 20 ml, selanjutnya didestilasi

5. Hasil destilasi, yaitu cairan dalam ujung tabung kondensor ditampung dalam erlenmeyer 125 ml yang berisi 10 ml larutan H_3BO_3 dan 3 tetes indikator *Methyl Red* yang ada di bawah kondensor.
6. Setelah volume hasil tampungan (destilat) menjadi 10 ml dan berwarna hijau kebiruan, destilasi dihentikan dan destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai berwarna merah muda pertama.
7. Perlakuan yang sama dilakukan juga terhadap blanko. Kadar Nitrogen total dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml titrasi sampel} - \text{ml titrasi blanko}) \times \text{N HCl} \times 14,008}{\text{Berat sampel} \times 1000 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% \text{ P} = \% \text{ N} \times 6,25$$



Lampiran 6. Dokumentasi Pembuatan Bubuk Tulang Ikan Bandeng (*Chanos chanos*)



Tulang ikan bandeng



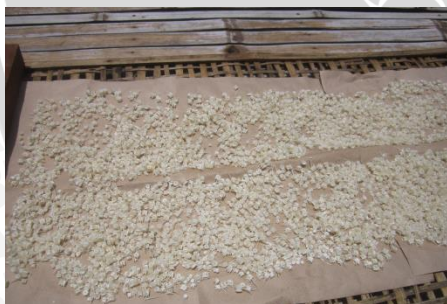
Dicuci dengan air bersih



Autoclaving 121°C 1 atm selama ±3 jam



Perebusan 100 °C selama ±30



Pengeringan dengan sinar matahari



Penebunan dengan disc mill

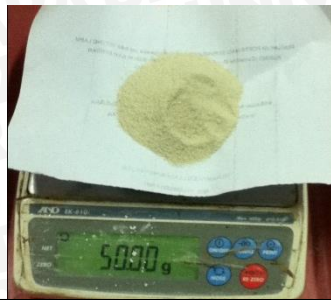


Bubuk tulang ikan bandeng

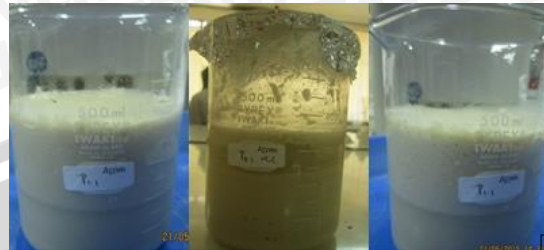


Diayak dengan ayakan 100 mesh

Lampiran 7. Dokumentasi Ekstraksi Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng (*Chanos canos*)



Bubuk tulang ikan bandeng



Perendaman dengan HCl 1 N selama 24, 48 dan 72 jam



Pendinginan



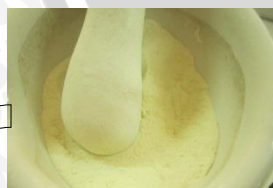
Ekstraksi 100 °C selama 60 menit



Filtrasi



Netralisasi



Penghalusan



Pengeringan dengan oven 50 °C



Pengayakan 200 mesh



Nanokalsium

Lampiran 8. Dokumentasi Pengujian Kadar Kasium



Destruksi



Filtrasi



Pengenceran



Pengujian AAS

Lampiran 9. Dokumentasi Pengujian Derajat Putih (Warna)



Color reader

Lampiran 10. Dokumentasi Pengujian Kelarutan Kalsium



Pemanasan dengan hotplate



Sentrifuse



Fitrasi



Pengujian dengan AAS

Lampiran 11. Dokumentasi Analisis Ukuran Partikel



Preparasi sampel



Pengukuran absorpsi



Pengujian dengan PSA

Lampiran 12. Dokumentasi Pengujian Bioavailabilitas



Adaptasi tikus



Penimbangan berat tikus



Penyondelan obat cacing



Persiapan alat bedah



Tikus setelah dibius



Pembedahan



Bagian usus tikus



Pencucian usus dengan NaCl 0,9%



Usus di



usus dibalik dengan bantuan batang gelas



Usus diikat pada kanula tabung Crane



Tabung dipasang pada shaker waterbath



Tabung dialiri gas oksigen



Pengujian Ca terabsorpsi dengan AAS

Lampiran 13. Data Rendemen Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Rendemen (%)					Total	Rerata	ST Deviasi
	1	2	3	4	5			
P0	10.55	10.39	10.56	10.34	10.59	52.43	10.49	0.11
P1	5.52	5.28	5.51	5.52	5.40	27.22	5.44	0.10
P2	7.54	6.93	7.25	7.40	7.24	36.34	7.27	0.23
P3	7.39	6.30	7.05	7.22	6.85	34.79	6.96	0.42
Total	30.99	28.90	30.36	30.47	30.07	150.79	30.16	

Lampiran 14. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Rendemen Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	1136.83				
SK	db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	67.42	22.47	356.53	3.24
Galat	16	1.01	0.06		
Total	19	68.43			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap rendemen nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 15. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Rendemen Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	5.44	6.96	7.72	10.49	Notasi
BNT 5% 0.34	P1	5.44				a
	P3	6.96	1.52			b
	P2	7.27	1.82	0.31		b
	P0	10.49	5.04	3.53	3.22	c

Lampiran 16. Data Kadar Air Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Kadar Air (%)					Total	Rerata	ST DEVIASI
	1	2	3	4	5			
P0	4.10	4.10	4.03	4.14	4.06	20.43	4.09	0.04
P1	4.20	3.96	4.09	3.87	4.16	20.28	4.06	0.14
P2	4.08	3.88	4.18	4.01	3.98	20.13	4.03	0.11
P3	4.19	4.03	3.81	4.01	4.37	20.41	4.08	0.21
Total	16.57	15.97	16.11	16.03	16.57	81.26	16.	

Lampiran 17. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Air Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	246.65				
SK	db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	0.01	0.004	0.19	3.24
Galat	16	0.31	0.019		
Total	19	0.32			

Fhitung < F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman tidak berpengaruh nyata terhadap kadar air nanokalsium tulang ikan bandeng

Lampiran 18. Data Kadar Lemak Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Kadar Lemak (%)					Total	Rerata	ST DEVIASI
	1	2	3	4	5			
P0	6.40	6.46	6.39	6.41	6.51	32.17	6.43	0.05
P1	2.08	2.31	2.63	2.37	1.89	11.28	2.26	0.28
P2	1.60	1.77	1.36	2.01	1.41	8.15	1.63	0.27
P3	1.02	1.45	1.31	1.89	1.45	7.12	1.42	0.31
Total	11.10	11.99	11.69	12.68	11.26	58.72	11.74	

Lampiran 19. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Lemak Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	172.40				
SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	83.45	27.82	439.90	3.24
Galat	16	1.01	0.06		
Total	19	84.46			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap kadar lemak nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 20. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Lemak Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	1.42	1.63	2.26	6.43	Notasi
BNT 5% 0.34	P3	1.42				a
	P2	1.63	0.21			a
	P1	2.26	0.84	0.63		b
	P0	6.43	5.01	4.80	4.17	c

Lampiran 21. Data Kadar Protein Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Kadar Protein (%)					Total	Rerat a	ST Deviasi
	1	2	3	4	5			
P0	11.60	11.58	11.80	11.85	11.68	58.51	11.70	0.12
P1	5.72	5.98	5.85	4.91	5.56	28.02	5.60	0.42
P2	5.35	5.18	5.26	5.30	5.24	26.33	5.27	0.06
P3	4.61	4.85	5.13	4.67	4.76	24.02	4.80	0.20
Total	27.28	27.59	28.04	26.73	26.73	136.88	27.38	

Lampiran 22. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Protein Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	936.81					
SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	
Perlakuan	3	158.95	52.98	903.33	3.24	
Galat	16	0.94	0.06			
Total	19	159.89				

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap kadar protein nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 23. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Protein Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	4.80	5.27	5.60	11.70	Notasi
BNT 5% 0.32	P3	4.80				a
	P2	5.27	0.47			b
	P1	5.60	0.80	0.33		c
	P0	11.70	6.90	6.44	6.10	d

Lampiran 24. Data Kadar Abu Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Kadar Abu (%)					Total	Rerata	ST Deviasi
	1	2	3	4	5			
P0	73.90	74.96	74.20	73.87	74.26	371.19	74.24	0.44
P1	85.92	85.95	85.75	86.33	85.77	429.72	85.94	0.23
P2	86.24	86.83	86.45	87.34	86.53	433.39	86.68	0.43
P3	87.00	86.79	87.09	86.45	87.20	434.53	86.91	0.30
Total	334.06	334.53	333.49	333.99	333.76	1668.83	333.77	

Lampiran 25. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Abu Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	139249.68				
SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	2.53	1.26	11.71	3.88
Galat	16	1.30	0.11		
Total	19	3.82			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap kadar abu nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

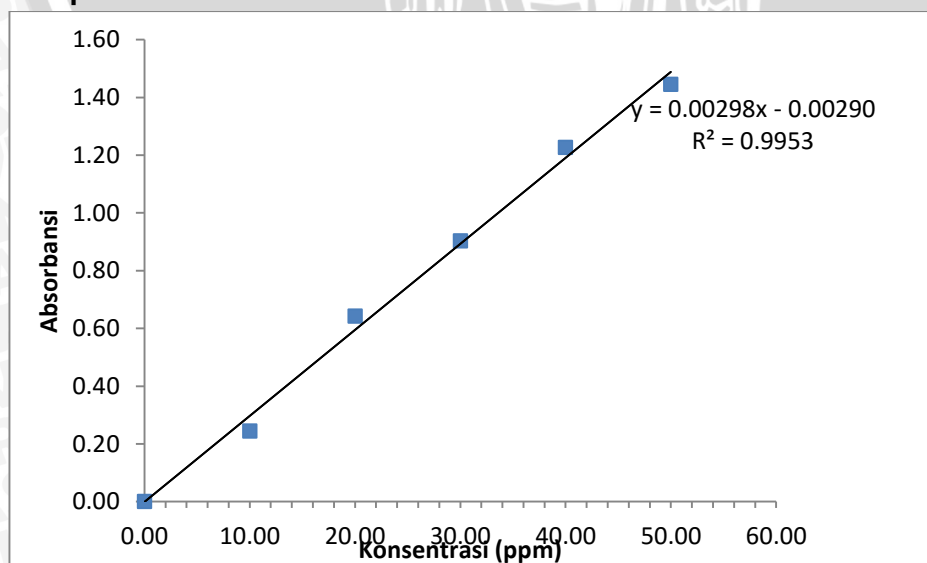
Lampiran 26. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Abu Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	74.24	81.58	83.28	84.06	Notasi
BNT 5% 0.48	P0	74.24				a
	P1	85.94	11.71			b
	P2	86.68	12.44	0.73		c
	P3	86.91	12.67	0.96	0.23	c

Lampiran 27. Data Larutan Standar Kalsium dan Absorbansinya

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Persamaan Garis
1	10.00	0.2446	$y = 0.00298x - 0.00290$
2	20.00	0.6428	
3	30.00	0.9029	
4	40.00	1.2272	
5	50.00	1.4446	

Lampiran 28. Kurva Kalibrasi Kalsium



Lampiran 29. Data Kadar Kalsium Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Kadar Kalsium (%)					Total	Rerata	ST dev
	1	2	3	4	5			
P0	25.89	25.80	26.06	25.96	25.74	129.44	25.89	0.13
P1	35.48	33.09	36.89	35.25	34.67	175.38	35.08	1.38
P2	39.38	37.78	39.39	36.91	37.01	190.47	38.09	1.23
P3	42.18	39.58	40.63	40.12	42.21	204.72	40.94	1.20
Total	142.93	136.24	142.96	138.24	139.62	700.00	140.00	

Lampiran 30. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Kalsium Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	24500.35				
SK	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	639.64	213.21	175.24	3.24
Galat	16	19.47	1.22		
Total	19	659.10			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap kadar kalsium nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT

Lampiran 31. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Kadar Kalsium Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

BNT 5% 1.48	Perlakuan	25.89	35.08	38.09	40.94	Notasi
	P0	25.89				
P1	35.08	9.19				b
P2	38.09	12.20	3.02			c
P3	40.94	15.06	5.87	2.85		d

Lampiran 32. Data Derajat Putih Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Derajat Putih					Total	Rerata	ST Deviasi
	1	2	3	4	5			
P0	51.30	51.00	51.20	50.90	51.10	255.50	51.10	
P1	56.20	55.60	57.80	57.20	55.90	282.70	56.54	0.93
P2	59.80	60.30	59.80	59.60	60.00	299.50	59.90	0.26
P3	61.10	60.40	61.60	61.30	60.60	305.00	61.00	0.49
Total	228.40	227.30	230.40	229.00	227.60	1142.70	228.54	

Lampiran 33. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Derajat Putih Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	65288.16				
SK	db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	296.79	98.93	330.32	3.24
Galat	16	4.79	0.30		
Total	19	301.59			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap derajat putih nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 34. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Derajat Putih Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	51.10				Notasi
	P0	51.10				a
BNT 5%	P1	56.54	5.44			b
0.73	P2	59.90	8.80	3.36		c
	P3	61.00	9.90	4.46	1.10	d

Lampiran 35. Data Derajat Keasaman (pH) Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Ulangan					Total	Rerata	ST DEVIASI
	1	2	3	4	5			
P0	7.20	7.40	7.60	7.40	7.40	37.00	7.40	0.14
P1	6.40	6.50	6.70	6.50	6.80	32.90	6.58	0.16
P2	6.10	6.30	6.60	6.20	6.70	31.90	6.38	0.26
P3	5.90	6.10	6.40	6.10	6.30	30.80	6.16	0.19
Total	25.60	26.30	27.30	26.20	27.20	132.60	26.52	

Lampiran 36. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap pH Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	879.14				
SK	db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	4.39	1.46	38.54	3.24
Galat	16	0.61	0.04		
Total	19	5.00			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap pH nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 37. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap pH Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Nilai BNT	Perlakuan	6.16	6.38	6.58	7.40	Notasi
BNT 5% 0.26	P3	6.16				a
	P2	6.38	0.22			a
	P1	6.58	0.42	0.2		b
	P0	7.40	1.24	1.02	0.82	c

Lampiran 38. Data Kelarutan Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Ulangan					Total	Rerata	ST DEVIASI
	1	2	3	4	5			
P0	7.57	7.44	7.22	7.72	7.88	37.83	7.57	0.25
P1	10.93	11.12	10.49	11.08	10.67	54.29	10.86	0.27
P2	11.56	11.75	11.38	11.89	12.01	58.58	11.72	0.25
P3	11.08	11.21	11.15	11.72	11.92	57.09	11.42	0.38
Total	41.14	41.52	40.24	42.41	42.48	207.78	41.56	

Lampiran 39. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Kelarutan Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	2158.73				
SK	db	JK	KT	F Hitung	F 5%
Perlakuan	3	55.07	18.36	213.60	3.24
Galat	16	1.38	0.09		
Total	19	56.45			

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap kelarutan nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 40. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Kelarutan Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

	Perlakuan	7.57	10.86	11.42	11.72	Notasi
BNT 5% 0.39	P0	7.57				a
	P1	10.86	3.29			b
	P3	11.42	3.85	0.56		c
	P2	11.72	4.15	0.86	0.30	c

Lampiran 41. Data Distribusi ukuran Partikel Sampel P0 (Bubuk Tulang Bandeng)

Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent
0.4000	0.0	5.615	0.0	78.82	0.0	1106	0.0
0.4632	0.0	6.503	0.0	91.28	0.0	1281	0.0
0.5365	0.0	7.531	0.0	105.7	0.0	1484	0.0
0.6213	0.0	8.721	0.0	122.4	0.0	1718	0.0
0.7195	0.0	10.10	0.0	141.8	0.0	1990	0.0
0.8332	0.0	11.70	0.0	164.2	0.0	2305	0.0
0.9649	0.0	13.54	0.0	190.1	0.0	2669	0.0
1.117	0.0	15.69	0.0	220.2	0.0	3091	0.0
1.294	0.0	18.17	0.0	255.0	0.0	3580	0.0
1.499	0.0	21.04	0.0	295.3	0.0	4145	0.0
1.736	0.0	24.36	0.0	342.0	14.8	4801	0.0
2.010	0.0	28.21	0.0	396.1	31.8	5560	0.0
2.328	0.0	32.67	0.0	458.7	33.7	6439	0.0
2.696	0.0	37.84	0.0	531.2	18.4	7456	0.0
3.122	0.0	43.82	0.0	615.1	1.4	8635	0.0
3.615	0.0	50.75	0.0	712.4	0.0	1.000e4	0.0
4.187	0.0	58.77	0.0	825.0	0.0		
4.849	0.0	68.06	0.0	955.4	0.0		

Lampiran 42. Data Distribusi ukuran Partikel Sampel P1 (Perendaman 24 jam)

Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent
0.4000	0.0	5.615	0.0	78.82	3.7	1106	0.0
0.4632	0.0	6.503	0.0	91.28	7.6	1281	0.0
0.5365	0.0	7.531	0.0	105.7	8.5	1484	0.0
0.6213	0.0	8.721	0.0	122.4	6.0	1718	0.0
0.7195	0.0	10.10	0.0	141.8	2.2	1990	0.0
0.8332	0.0	11.70	0.0	164.2	0.0	2305	0.0
0.9649	0.0	13.54	0.0	190.1	0.0	2669	0.0
1.117	0.0	15.69	0.0	220.2	3.4	3091	0.0
1.294	0.0	18.17	0.0	255.0	10.4	3580	0.0
1.499	0.0	21.04	0.0	295.3	17.3	4145	0.0
1.736	0.0	24.36	0.0	342.0	19.5	4801	0.0
2.010	0.0	28.21	0.0	396.1	15.0	5560	0.0
2.328	0.0	32.67	0.0	458.7	6.4	6439	0.0
2.696	0.0	37.84	0.0	531.2	0.0	7456	0.0
3.122	0.0	43.82	0.0	615.1	0.0	8635	0.0
3.615	0.0	50.75	0.0	712.4	0.0	1.000e4	0.0
4.187	0.0	58.77	0.0	825.0	0.0		
4.849	0.0	68.06	0.1	955.4	0.0		

Lampiran 43. Data Distribusi ukuran Partikel Sampel P2 (Perendaman 48 jam)

Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent
0.4000	0.0	5.615	0.0	78.82	5.2	1106	0.0
0.4632	0.0	6.503	0.0	91.28	3.5	1281	0.0
0.5365	0.0	7.531	0.0	105.7	0.9	1484	0.0
0.6213	0.0	8.721	0.0	122.4	0.0	1718	0.0
0.7195	0.0	10.10	0.0	141.8	0.0	1990	0.0
0.8332	0.0	11.70	0.0	164.2	1.1	2305	0.0
0.9649	0.0	13.54	0.0	190.1	8.1	2669	0.0
1.117	0.0	15.69	0.0	220.2	18.0	3091	0.0
1.294	0.0	18.17	0.0	255.0	24.2	3580	0.0
1.499	0.0	21.04	0.0	295.3	21.6	4145	0.0
1.736	0.0	24.36	0.0	342.0	11.0	4801	0.0
2.010	0.0	28.21	0.0	396.1	0.8	5560	0.0
2.328	0.0	32.67	0.0	458.7	0.0	6439	0.0
2.696	0.0	37.84	0.0	531.2	0.0	7456	0.0
3.122	0.0	43.82	0.0	615.1	0.0	8635	0.0
3.615	0.0	50.75	0.0	712.4	0.0	1.000e4	0.0
4.187	0.0	58.77	1.4	825.0	0.0		
4.849	0.0	68.06	4.2	955.4	0.0		

Lampiran 44. Data Distribusi ukuran Partikel Sampel P3 (Perendaman 72 jam)

Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent
0.4000	0.0	5.615	0.0	78.82	4.1	1106	0.0
0.4632	0.0	6.503	0.0	91.28	1.5	1281	0.0
0.5365	0.0	7.531	0.0	105.7	0.0	1484	0.0
0.6213	0.0	8.721	0.0	122.4	0.0	1718	0.0
0.7195	0.0	10.10	0.0	141.8	0.0	1990	0.0
0.8332	0.0	11.70	0.0	164.2	0.3	2305	0.0
0.9649	0.0	13.54	0.0	190.1	7.1	2669	0.0
1.117	0.0	15.69	0.0	220.2	17.8	3091	0.0
1.294	0.0	18.17	0.0	255.0	25.0	3580	0.0
1.499	0.0	21.04	0.0	295.3	22.8	4145	0.0
1.736	0.0	24.36	0.0	342.0	12.1	4801	0.0
2.010	0.0	28.21	0.0	396.1	1.4	5560	0.0
2.328	0.0	32.67	0.0	458.7	0.0	6439	0.0
2.696	0.0	37.84	0.0	531.2	0.0	7456	0.0
3.122	0.0	43.82	0.0	615.1	0.0	8635	0.0
3.615	0.0	50.75	0.1	712.4	0.0	1.000e4	0.0
4.187	0.0	58.77	2.8	825.0	0.0		
4.849	0.0	68.06	4.9	955.4	0.0		

Lampiran 45. Data Bioavailabilitas Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perendaman	Perlakuan		Ulangan			Total	Rerata	ST DEVIASI
	Waktu (Menit)		1	2	3			
P0	10		3.80	3.80	3.84	11.44	3.81	0.02
	20		4.42	4.42	4.42	13.25	4.42	0.00
	30		6.99	7.01	6.98	20.97	6.99	0.01
P1	10		9.78	10.05	9.78	29.61	9.87	0.15
	20		10.11	10.17	10.02	30.31	10.10	0.08
	30		10.33	10.27	10.21	30.81	10.27	0.06
P2	10		10.28	10.14	10.24	30.65	10.22	0.07
	20		10.46	10.25	10.39	31.10	10.37	0.11
	30		10.68	10.45	10.51	31.64	10.55	0.12
P3	10		10.04	10.31	10.26	30.61	10.20	0.14
	20		10.18	10.57	10.36	31.11	10.37	0.19
	30		10.26	10.85	10.67	31.79	10.60	0.30
Total			107.33	108.27	107.68	323.28	107.76	

Lampiran 46. Analisis Sidik Ragam Pengaruh Lama Waktu Perendaman Terhadap Bioavailabilitas Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

FK	2903.09					
SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan:	11	201.37	18.31	1030.97	2.26	3.18
A	3	183.64	61.21	3447.46	3.05	4.82
B	2	7.43	3.71	209.17	3.44	5.72
AB	6	10.30	1.71	96.67	2.55	3.76
Galat	22	0.39	0.02			
Total	35	201.80				

Fhitung > F 5% maka perlakuan lama waktu perendaman memberikan pengaruh nyata terhadap Bioavailabilitas nanokalsium tulang ikan bandeng, sehingga diuji lanjut dengan uji BNT.

Lampiran 47. Uji Lanjut BNT Lama Waktu Perendaman Terhadap Bioavailabilitas Nanokalsium Tulang Ikan Bandeng

Perlakuan	Rerata	Notasi
P0.10	3.81	a
P0.20	4.42	b
P0.30	6.99	c
P1.10	9.87	d
P1.20	10.10	e
P3.10	10.20	ef
P2.10	10.22	ef
P1.30	10.27	ef
P2.20	10.37	f
P3.20	10.37	f
P2.30	10.55	fg
P.30	10.60	g

Lampiran 48. Hasil Ranking Parameter Terhadap Mutu Nanokalsium dan Bobot Masing-Masing Parameter

Parameter	Panelis																				Jumlah	Rata-rata	Ranking	BV	BN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
Rendemen	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	7	7	7	7	7	7	7	6	140	7.00	4	0.73	0.13
Kadar Air	3	3	2	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4	66	3.30	7	0.35	0.06
Kadar Lemak	5	4	3	4	2	3	4	3	2	2	2	4	2	2	3	2	1	1	2	3	54	2.70	9	0.28	0.05
Kadar Protein	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	25	1.25	10	0.13	0.02
Kadar Abu	6	5	5	6	5	5	5	6	6	6	6	5	6	6	5	6	6	6	6	7	114	5.70	5	0.60	0.10
Kadar Kalsium	9	9	10	10	10	9	10	9	9	10	10	9	10	9	9	9	10	9	10	9	189	9.45	2	0.99	0.17
Derajat Putih	4	6	6	5	6	6	6	5	5	5	5	6	5	5	6	5	5	5	5	5	106	5.30	6	0.55	0.10
pH	2	2	4	1	4	1	2	1	4	4	4	2	4	4	2	4	3	3	3	2	56	2.80	8	0.29	0.05
Kelarutan Kalsium	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	159	7.95	3	0.83	0.14
Bioavailabilitas	10	10	9	9	9	10	9	10	10	9	9	10	9	10	10	10	9	10	9	10	191	9.55	1	1.00	0.17
Jumlah																					1100	55		5.76	1

Lampiran 49. Bobot Parameter

Parameter	Perlakuan			Terbaik	Terjelek	Selisish
	24 jam	48 jam	72 jam			
Bioavailabilitas	10.27	10.55	10.60	10.60	10.27	0.33
Kadar Kalsium	35.08	38.09	40.94	40.94	35.08	5.86
Kelarutan Kalsium	10.86	11.72	11.42	11.72	10.86	0.86
Rendemen	5.44	7.27	6.96	7.27	5.44	1.83
Kadar Abu	85.94	86.68	89.91	89.91	85.94	3.97
Derajat Putih	56.54	59.90	61.00	61.00	56.54	4.46
Kadar Air	4.06	4.03	4.08	4.03	4.08	-0.05
pH	6.58	6.38	6.16	6.16	6.58	-0.42
Kadar Lemak	2.26	1.63	1.42	1.42	2.26	-0.84
Kadar Protein	5.60	5.27	4.80	4.80	5.60	-0.80

Lampiran 50. Indeks Efektifitas de Garmo (Penentuan Perlakuan Terbaik)

Parameter	BV	BN	24 jam		48 jam		72 jam	
			Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh
Bioavailabilitas	1.00	0.17	0.00	0.00	0.85	0.15	1.00	0.17
Kadar Kalsium	0.99	0.17	0.00	0.00	0.51	0.09	1.00	0.17
Kelarutan Kalsium	0.83	0.14	0.00	0.00	1.00	0.14	0.65	0.09
Rendemen	0.73	0.13	0.00	0.00	1.00	0.13	0.83	0.11
Kadar Abu	0.60	0.10	0.00	0.00	0.19	0.02	1.00	0.10
Derajat Putih	0.55	0.10	0.00	0.00	0.75	0.07	1.00	0.10
Kadar Air	0.35	0.06	0.40	0.02	1.00	0.06	0.83	0.05
Ph	0.29	0.05	0.00	0.00	0.48	0.02	1.00	0.05
Kadar Lemak	0.28	0.05	0.00	0.00	0.75	0.04	1.00	0.05
Kadar Protein	0.13	0.02	0.00	0.00	0.41	0.01	1.00	0.02
Jumlah				0.02		0.73		0.92 ^{*)}

*) Perlakuan terbaik