

## KARAKTERISASI TEPUNG TULANG IKAN BELIDA (*Chitala sp.*) SEBAGAI SUMBER KALSIUM DENGAN METODE HIDROLISIS PROTEIN

(*Properties of Belida (Chitala sp.) Fish Bone Powder As Calcium Source Based On Protein Hydrolysis Method*)

Hilman Fadhli Putranto<sup>1</sup>, Andi Noor Asikin<sup>2</sup> dan Indrati Kusumaningrum<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Konsentrasi Teknologi Hasil Perikanan Jurusan Budidaya Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman

<sup>2</sup>Teknologi Hasil Perikanan Jurusan Budidaya Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman

Jl. Gunung Tabur No. 1 Kampus Gunung Kelua Samarinda

E-mail: hilman.f.p@hotmail.com

### ABSTRACT

Belida (*Chitala sp.*) bone is one of the waste from amplang processing which not treated properly yet until now. The aim of this study were to determine the best condition of presto processing time and boiling frequency by protein hydrolysis method based on based on highest calcium obtained and to characterize properties of fish bone powder obtained. This study used Completely Randomized Design (CRD) with four treatment and three replications. Observed variable in this study were yield moisture content, protein content, fat content, ash content, and calcium content. The condition of treatment were P2R1 (2 hour presto and once boiling), P2R2 (2 hour presto and twice boiling), P3R1 (3 hour presto and once boiling), and P3R2 (3 hour presto and twice boiling). The results showed the treatment of P3R2 was the best treatment to obtain highest calcium content of fish bone powder. The properties of belida bone powder that P3R2 obtained were 27.77 % of yield, 3.12 % of moisture content, 0.26 % of protein content, 0.91 % of fat content, 88.13% of ash content, and 30.93 % of calcium content.

**Keywords:** *Belida, Boiling Frequency, Calcium, Presto Processing, and Protein Hydrolysis.*

### PENDAHULUAN

Ikan belida (*Chitala sp.*) merupakan jenis ikan air tawar yang hidupnya di sungai, namun hanya terdapat di beberapa daerah di Indonesia termasuk Kalimantan Timur. Ikan belida merupakan ikan lokal yang cukup disukai oleh masyarakat yang selama ini hanya diperoleh dari usaha penangkapan untuk memenuhi kebutuhan masyarakat. Biasanya ikan belida dipasarkan dalam keadaan segar, baik untuk kebutuhan rumah makan maupun untuk bahan baku pengolahan kerupuk dan amplang.

Tulang ikan merupakan salah satu limbah dari industri perikanan yang belum dimanfaatkan dengan baik. Salah satu unit usaha produksi perikanan yang menghasilkan limbah tulang ikan adalah unit usaha amplang yang ada di Samarinda. Tulang ikan terdiri dari senyawa organik dan senyawa anorganik (mineral). Menurut Jung *et al.* (2005), tulang ikan hoki (*Johnius belengerii*) mengandung bahan organik sekitar 30,54% (bk) yang terdiri dari protein 28,04%, lipid 1,94% dan karbohidrat 0,56%, sedangkan bahan mineral anorganiknya sekitar 69,46% (bk) terutama

terdiri dari 59,69% kalsium (Ca) dan 35,81% fosfor (P).

Semua bagian dari ikan merupakan komponen organik yang seharusnya masih bisa dimanfaatkan sebagai sumber bahan pangan hewani. Penanganan limbah industri perikanan selama ini umumnya hanya dikubur dan diolah menjadi pakan ternak. Tulang ikan merupakan salah satu limbah hasil industri perikanan yang belum dimanfaatkan dengan baik. Salah satu hasil perairan yang kaya akan kalsium adalah ikan terutama bagian tulangnya. Kalsium dari tulang ikan memiliki kualitas cukup bagus serta mudah diperoleh. Salah satu pemanfaatan tulang ikan yaitu pengolahan menjadi tepung tulang. Pemanfaatan tepung tulang dapat dijadikan suplemen dan obat pencegah osteoporosis (Jiancong *et al.* 2010). Selain itu, tepung tulang dapat juga dimanfaatkan dalam pembuatan mie kering (Mulia 2004).

Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi terbaik pada proses pembuatan tepung tulang ikan belida (*Chitala sp.*) berdasarkan karakteristik dan kandungan kalsium tertinggi. Manfaat penelitian ini adalah bahan informasi ilmiah mengenai kandungan kalsium yang diperoleh dari tepung tulang ikan belida (*Chitala sp.*) sebagai sumber kalsium dalam bidang pangan maupun non pangan.

## METODE PENELITIAN

### Preparasi Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah tulang ikan belida (*Chitala sp.*). Tulang ikan belida diperoleh dari salah satu industri pengerikan ikan di Samarinda. Bahan lain yang digunakan antara lain NaOH, air,. Peralatan yang digunakan antara lain *hotplate*, oven, panci aluminium, panci presto (merk maxim), blender, timbangan analitik, *freezer* dan termometer.

### Metode Penelitian

Proses pengolahan tepung tulang dalam penelitian ini merupakan modifikasi dari metode yang telah dilakukan oleh Trilaksani (2006). Proses pengolahan tulang dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

#### a. Pencucian

Tulang ikan belida (*Chitala sp.*) dalam kondisi beku dilelehkan dengan air mengalir. Selanjutnya tulang dicuci dan ditiriskan.

#### b. Perebusan tulang

Tulang yang diambil dari limbah pengolahan amplang dimasukkan ke dalam panci aluminium pada saat suhu air mencapai 80°C. Tulang direbus selama 30 menit. Perebusan awal ini dilakukan untuk mempermudah pembersihan tulang dari daging, darah dan lemak yang masih menempel pada tulang.

#### c. Pembersihan

Tulang yang telah direbus kemudian dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan daging-daging ikan yang masih menempel pada tulang sampai cukup bersih. Selanjutnya tulang yang telah bersih ditiriskan dan ditimbang sebanyak 200 gram untuk setiap perlakuan.

#### d. Proses Presto

Proses presto merupakan proses pemasakan menggunakan panci bertekanan yang dapat mempercepat lama waktu pemasakan dibanding tanpa menggunakan panci presto. Proses presto ini berfungsi untuk menghilangkan lemak yang terdapat pada tulang serta mendenaturasi protein. Selain itu, proses presto juga bertujuan untuk mengempukkan tulang ikan sehingga mempermudah proses penepungan. Tulang ikan belida (*Chitala sp.*) yang telah ditimbang

(200 gram), selanjutnya dilakukan proses presto (P) dengan dua perlakuan lama presto yaitu 2 jam (P2) dan 3 jam (P3).

#### *e. Proses perebusan*

Proses perebusan merupakan kelanjutan perlakuan dari penelitian tersebut. Setelah tulang ikan dipresto sesuai perlakuan, maka dilanjutkan dengan proses perebusan (R) dengan dua perlakuan frekuensi perebusan, yaitu perebusan 1 kali (R1) dan perebusan 2 kali (R2) dengan lama perebusan untuk setiap frekuensi perebusan selama 30 menit. Perebusan tulang dilakukan dengan cara mendidihkan 2 liter air dalam panci aluminium dengan suhu 100°C. Selanjutnya, tulang ikan dimasukkan dan dibiarkan selama 30 menit.

Setelah direbus selama 30 menit, tulang ikan segera diangkat dan ditiriskan (R1). Sedangkan pada perlakuan 2 kali proses perebusan (R2), setelah proses perebusan pada perlakuan R1 dilanjutkan proses perebusan kedua dengan cara mengganti air perebusan pertama dan direbus dengan cara seperti pada perlakuan R1. Tulang yang telah menjalani perebusan selama 2 kali, selanjutnya ditiriskan.

#### *f. Ekstraksi Basa NaOH*

Proses ekstraksi basa NaOH adalah proses perendaman tulang di dalam larutan NaOH 1,5 N selama 2 jam pada suhu 60°C untuk masing-masing perlakuan. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan protein.

#### *g. Pencucian*

Tulang ikan ditempatkan pada kain saring selanjutnya dibilas menggunakan air mengalir. Proses ini bertujuan untuk menetralkan pH tulang ikan.

#### *h. Pengeringan*

Tulang ikan belida (*Chitala* sp.) selanjutnya diletakkan di atas tray yang telah dilapisi terlebih dahulu dengan lembaran aluminium foil. Tulang tersebut dikeringkan menggunakan oven pengering selama 48 jam pada suhu 65°C.

#### *i. Penepungan*

Tepung tulang yang telah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan tepung.

### **Rancangan Percobaan**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap, terdiri dari 4 perlakuan dan 3 ulangan yaitu P2R1 (lama presto 2 jam, frekuensi perebusan 1 kali), P2R2 (lama presto 2 jam, frekuensi perebusan 2 kali), P3R1 (lama presto 3 jam, frekuensi perebusan 1 kali), dan P3R2 (lama presto 3 jam, frekuensi perebusan 2 kali). Data dianalisis keragamannya (ANOVA), dan bila hasilnya menunjukkan ada beda nyata, dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada selang kepercayaan 95% aplikasi Minitab® 17.1.0.

### **Prosedur Analisis**

Analisis penelitian ini meliputi rendemen, komposisi proksimat (kadar air, kadar protein, kadar lemak, kadar abu) dan kalsium. Analisis kadar air menggunakan metode thermogravimetri dengan mengacu pada AOAC (1995). Kadar protein dianalisis menggunakan metode semi mikro Kjeldahl berdasarkan AOAC (1995) dengan prinsip menghitung kandungan total nitrogen pada bahan yang selanjutnya dikonversi menjadi kadar protein. Analisis kadar lemak mengacu pada AOAC (1995). Analisis kadar abu dihitung dari sisa hasil pembakaran organik pada suhu 550°C berdasarkan AOAC (1995). Adapun perhitungan kalsium dilakukan

menggunakan metode titrasi permanganometri berdasarkan Sudarmadji (1984).

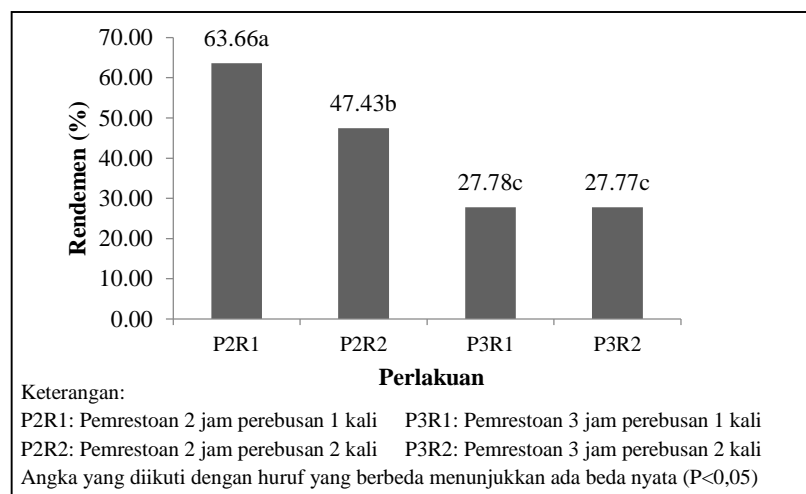
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen

Rendemen merupakan suatu parameter yang paling penting untuk mengetahui nilai ekonomis dan efektivitas suatu proses produk atau bahan. Perhitungan rendemen berdasarkan presentase perbandingan antara berat akhir dengan berat awal proses. Semakin besar rendemennya maka semakin tinggi pula nilai ekonomis produk tersebut, begitu pula nilai efektivitas dari produk tersebut (Amiarso 2003). Hasil pengamatan rendemen tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 1.

Hasil analisis ragam yang dilakukan terhadap rendemen menunjukkan bahwa

perlakuan lama waktu proses presto dan frekuensi per ebusan terdapat ada beda nyata ( $P < 0,05$ ). Penurunan rendemen tersebut diduga karena semakin banyak komponen nonmineral (air, protein, dan lemak) dalam bahan akan larut dengan semakin lama waktu yang digunakan (Nabil 2005). Nilai rendemen ini jauh lebih tinggi dari nilai rendemen tepung tulang ikan hasil penelitian Trilaksani (2006) yang sebesar 28,85% dan Apriliani (2010) yang hanya sebesar 8,85%. Rendemen yang tertinggi belum tentu akan menghasilkan kadar kalsium tertinggi, tetapi ditentukan juga oleh faktor-faktor lain seperti rendahnya kandungan protein dalam bahan (Murtiningrum 1997).

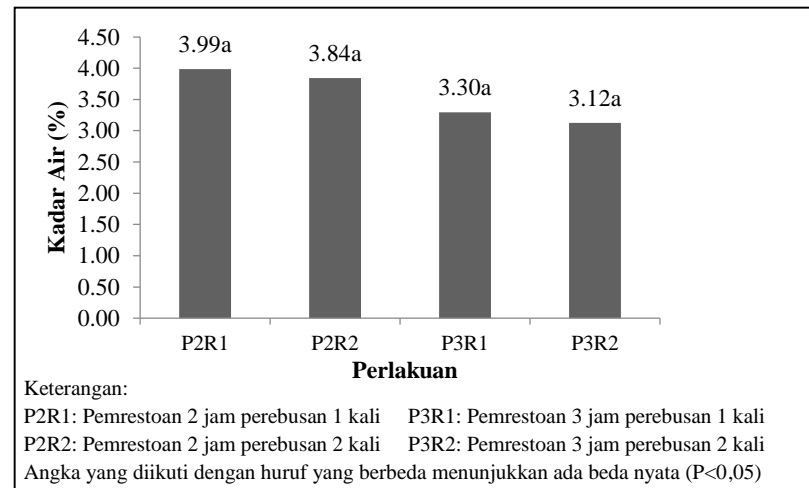


Gambar 1. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap rendemen tepung tulang ikan belida

### Kadar Air

Kadar air bahan pangan merupakan jumlah air yang dikandung bahan pangan dan sangat berpengaruh pada mutu dan keawetan

pangan (Martinez *et al.* 1998). Hasil pengamatan kadar air tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap kadar air tepung tulang ikan belida

Hasil analisis ragam yang dilakukan terhadap kadar air menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan tidak menunjukkan beda nyata ( $P > 0,05$ ) dalam menurunkan kadar air tepung tulang ikan. Tepung tulang ikan belida (*Chitala sp.*) yang dihasilkan mengandung kadar air yang lebih rendah dari nilai tepung tulang tuna oleh Trilaksani (2006), yaitu sebesar 5,60% bk namun, lebih tinggi dari tepung tulang nila pada penelitian Hemung (2013), yaitu sebesar 2.46% bk.

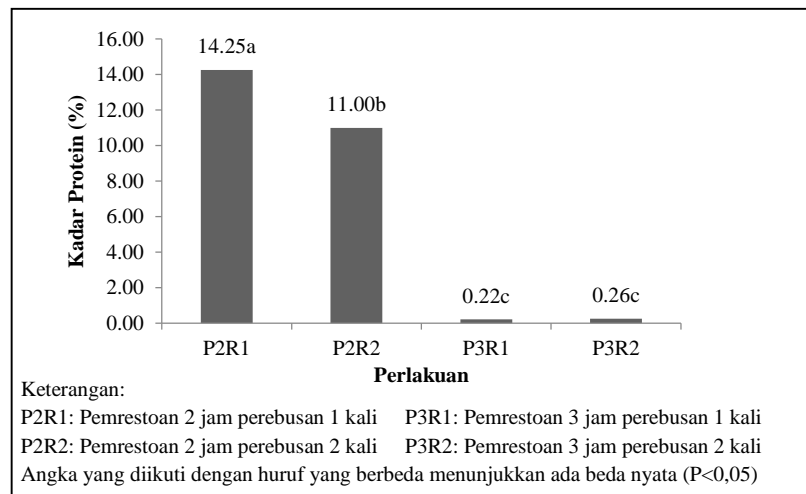
Perbedaan kadar air yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh metode pembuatan tepung dan teknik pengeringan tulang serta jenis ikan yang digunakan. Kadar air tepung tulang ikan belida masih berada pada kisaran standar yang ditetapkan SNI. Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3158-1992), tepung tulang memiliki kadar air maksimal 8%. Produk dengan kadar air yang rendah akan mempunyai daya awet yang lebih lama.

### 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). Dalam pembuatan tepung tulang ikan, kadar protein dihilangkan semaksimal mungkin dengan proses hidrolisis protein. Penghilangan protein bertujuan untuk meningkatkan kadar mineral/abu yang terkandung dalam tepung. Hasil pengamatan kadar protein tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 3.

Hasil analisis ragam yang dilakukan terhadap rendemen menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu proses presto dan frekuensi per ebusan terdapat ada beda nyata ( $P < 0,05$ ). Kadar protein tepung tulang ikan yang diperoleh cukup rendah, berada di bawah kadar protein tepung tulang ikan tuna yang diperoleh dalam penelitian Apriliani (2010) sebesar 33,50% yang tidak menggunakan metode hidrolisis protein dalam proses pembuatan tepung tulang. Namun, Hemung (2013) yang juga menggunakan metode hidrolisis protein memperoleh kadar protein sebesar 14,81% pada tepung tulang ikan nila. Walau demikian, kadar protein hasil penelitian ini masih lebih tinggi dibandingkan kadar protein yang diperoleh Trilaksani (2006) sebesar 1,29% pada tepung tulang ikan tuna dengan metode hidrolisis protein.

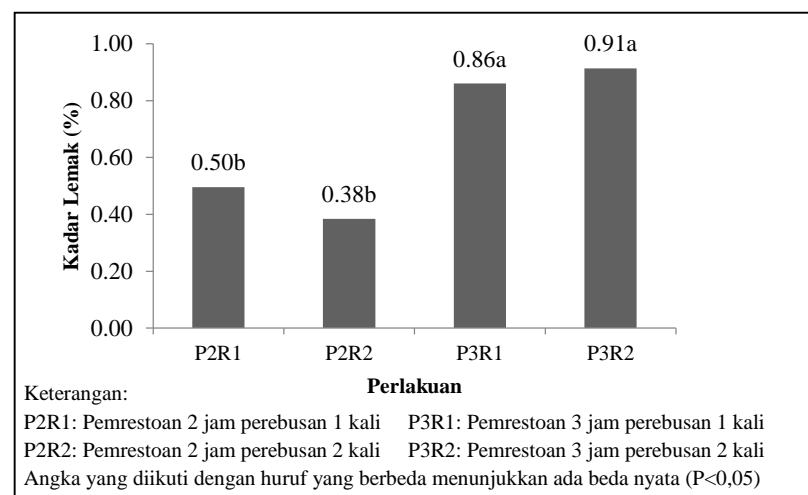


Gambar 3. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap kadar protein tepung tulang ikan Belida

### Kadar Lemak

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). Sehingga, kadar lemak tepung tulang ikan, kadar lemak yang lebih rendah lebih diharapkan. Hasil pengamatan kadar lemak tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap kadar lemak tepung tulang ikan Belida

Hasil analisis ragam yang dilakukan terhadap kadar lemak menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan menunjukkan ada beda

( $P < 0,05$ ) terhadap kadar lemak tepung tulang ikan yang diperoleh. Kadar lemak tepung tulang ikan belida (*Chitala sp.*) pada penelitian ini rendah dibandingkan dengan penelitian

terdahulu, kadar lemak tepung tulang nila (Hemung 2013) yang sebesar 5.82%, tepung tulang tuna (Trilaksani 2006) sebesar 4.13% dan tepung tulang patin (Kaya 2008) yang sebesar 2.09%. Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3158-1992) kadar lemak untuk tepung tulang ikan ditetapkan untuk mutu I adalah 3% bb dan mutu II sebesar 6% bb. Merujuk dari standar tersebut, maka kadar lemak tepung tulang ikan belida hasil penelitian ini termasuk ke dalam mutu I.

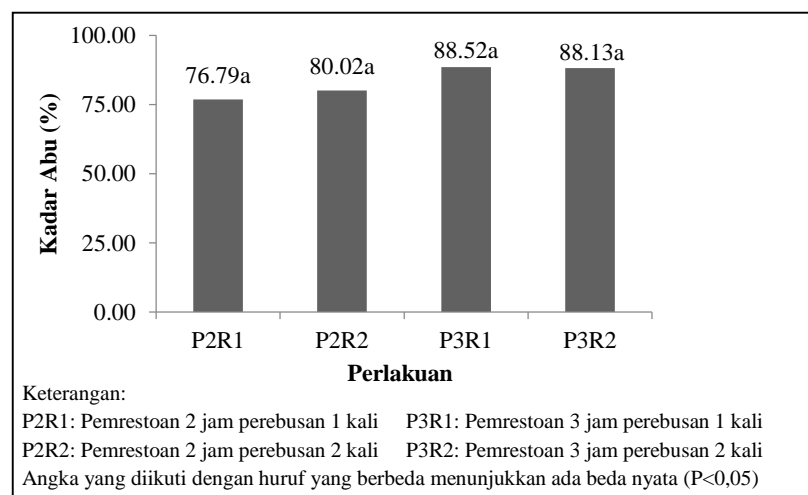
Phleger (1975) dalam Hemung (2013) menyatakan bahwa pada penelitian terdahulu telah melaporkan lemak mengisi tulang, khususnya tulang utama rangka ikan, yang terdiri dari banyak sendi tulang. Bahkan lemak tersebut tidak dapat dilepaskan dengan mudah, karena merupakan ikatan kompleks, dan susah dihilangkan hanya dengan merendam tulang dalam larutan alkali (Lee *et al.* 1975 dalam Hemung 2013). Toppe (2007) menyatakan bahwa kadar lemak dalam tulang erat kaitannya dengan lemak tubuh setiap spesies, dan biasanya ikan yang besar dan dewasa mengandung lemak yang tinggi. asam lemak

ikan merupakan asam lemak tak jenuh. Asam lemak dalam tepung tulang ikan tersebut pada beberapa spesies ditemukan mengandung asam lemak tak jenuh hampir 80%.

### Kadar Abu

Analisis kadar abu bertujuan untuk menentukan kadar abu total dan kandungan masing-masing mineral yang terdapat dalam tepung tulang ikan. Kandungan abu dalam bahan pangan menunjukkan jumlah bahan anorganik yang tersisa setelah bahan organik didestruksi (Sulaeman *et al.* 1995). Hasil pengamatan kadar lemak tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 5.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap meningkatkan kadar abu tepung tulang ikan belida (*Chitala* sp.). Hasil analisis ragam yang dilakukan terhadap kadar kalsium menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan memberikan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap kadar kalsium.



Gambar 5. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap kadar abu tepung tulang ikan belida

Berdasarkan hasil penelitian ini, kadar kalsium masih lebih tinggi dibandingkan

hasil penelitian sebelumnya. Sari (2013), dalam penelitian tersebut menggunakan ikan

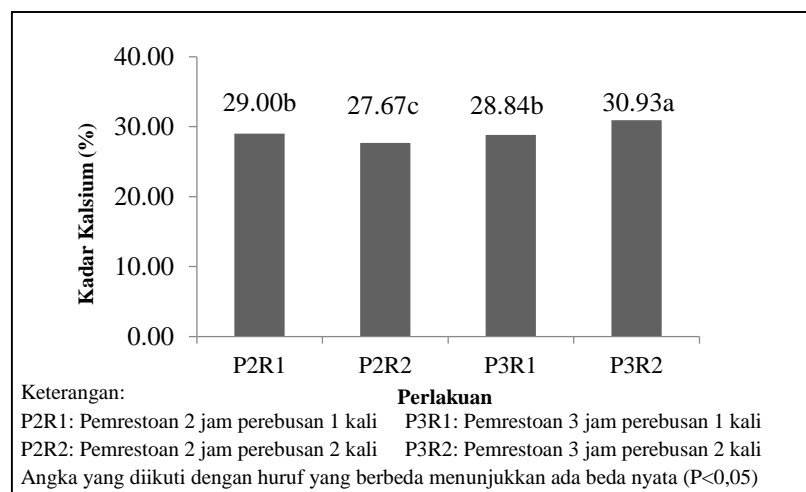
lele untuk pembuatan tepung tulang yang menghasilkan kadar kalsium sebesar 13,48% dan Kuryanti (2010) menggunakan ikan gabus

Kadar abu hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan kadar abu yang diperoleh Apriliani (2010) pada penelitiannya terhadap tepung tulang patin yaitu sebesar 33,5%. Sedangkan, Trilaksani (2006) pada tepung tulang tuna dan Hemung (2013) pada tepung tulang nila, berturut-turut memperoleh kadar abu sebesar 84,22% dan 75.83%. Kandungan abu yang tinggi dalam tepung tulang disebabkan karena komponen utama penyusun tulang adalah mineral. Tulang mengandung sel-sel hidup dan matriks intraseluler dalam bentuk garam mineral.

sebagai bahan baku pembuatan tepung tulang ikan dengan kadar kalsium sebesar 16,50%.

### Kadar Kalsium

Kalsium merupakan unsur kelima dan kation terbanyak di dalam tubuh, yaitu 1,5-2% dari seluruh tubuh. Lebih dari 99% kalsium terdapat di dalam tulang rawan dan gigi, sisanya di dalam cairan tubuh dan jaringan lunak (Nasoetion et al. 1995). Hasil pengamatan kadar lemak tepung tulang ikan belida disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Histogram lama waktu proses presto dan frekuensi perebusan terhadap kadar abu tepung tulang ikan belida

Kadar kalsium yang diperoleh dalam penelitian ini sedikit lebih rendah dibanding dengan kadar kalsium tepung tulang ikan tuna sebesar 39,24% hasil penelitian Trilaksani (2006). Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3158-1992) kadar kalsium untuk tepung tulang ikan ditetapkan untuk mutu I adalah 30% bb dan mutu II sebesar 20% bb. Merujuk dari standar tersebut, maka kadar kalsium tepung tulang ikan belida hasil penelitian ini termasuk ke dalam mutu I dan mutu II.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan P3R2 (lama proses presto 3 jam dan perebusan 2 kali) merupakan perlakuan terbaik untuk menghasilkan tepung tulang ikan belida (*Chitala sp.*) dengan kadar kalsium tertinggi yaitu sebesar 30,93% dengan rendemen sebesar 27,77%. Karakteristik kimiawi tepung tulang yang dihasilkan pada perlakuan terbaik



meliputi kadar air 3,12%, kadar protein 0,26%, kadar lemak 0,91%, dan kadar abu 88,13%.

### Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini perlu adanya penelitian lanjutan mengenai aplikasi penggunaan tepung tulang ikan belida yang kaya kalsium sebagai fortifikasi dalam pengolahan pangan maupun non pangan.

### DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical and Chemists. 1995. Official Methods of Analysis the 16th ed. Virginia: Inc. Arlington.
- Amiarso., 2003. Pengaruh penambahan daging ikan kambing-kambing (*Abalistes steilatus*) terhadap mutu kerupuk gemblong khas Kuningan Jawa Barat. Skripsi. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB
- Apriliani, IS., 2010. Pemanfaatan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) Pada Pembuatan Cone Es krim. Skripsi. Bogor: IPB.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1992. Standar Nasional Indonesia 01-3158. Tepung tulang untuk bahan baku makanan ternak. Jakarta.
- Jung WK, Park PJ, Byun HG, Moon SH, Kim SK. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. Food Chem 91: 333-340.
- Hemung, B., 2013. Properties of Tilapia Bone Powder and Its Calcium Bioavailability Based on Transglutaminase Assay. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. Vol.3(4)306-309. DOI: 10.7763/IJBBB.2013.V3.219
- Jiancong, H., Shanggui, D., Chao, X., Guozhong, T., 2010. Preparation and biological efficacy of haddock bone calcium tablets. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Vol. 28(2): 371-378. DOI: 10.1007/s00343-010-9019-0
- Minitab, Inc., 2014. Minitab Statistical Software, Release 17 for Windows, State College, Pennsylvania. Minitab® is a registered trademark of Minitab, Inc.
- Mulia. 2004. Kajian potensi limbah tulang ikan patin (*Pangasius* sp) sebagai alternatif sumber kalsium dalam produk mi kering. Skripsi. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB.
- Murtiningrum. 1997. Ekstraksi kalsium dari tulang ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis* L) dengan teknik deproteinasi [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.
- Nabil, M. 2005. Pemanfaatan Limbah tulang Ikan Tuna (*Thunnus* sp.) Sebagai Sumber Kalsium Dengan Metode Hidrolisis Protein. Skripsi. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. IPB
- Trilaksani, W., Salamah E. & 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
- Toppe, S. Albrektsen, B. Hope, and Aksnes, A., 2007. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. Comparative Biochemical and Physiology, vol. 146B: 395-401.

Sudarmadji, Slamet. 1984. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

*Diktat Jurusan Gizi Masyarakat dan Kesehatan Keluarga*. Bogor: Fakultas Pertanian, IPB.

Sulaeman A, Anwar F, Rimbawan, Marliyati SA. 1995. *Metode Penetapan Zat Gizi*.