

Aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM) pada Optimasi Ekstraksi Kalsium Tulang Lele

The Application of *Response Surface Methodology* (RSM) on the Optimization of Catfish Bone Calcium Extraction

Susana E. Ratnawati*, N. Ekantari, R.W. Pradipta & B.L. Paramita

Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

*Penulis untuk korespondensi: e-mail: susana.endah@ugm.ac.id

Abstrak

Penelitian dirancang untuk mengetahui kondisi optimum proses ekstraksi kalsium dari tulang lele melalui *Response Surface Methodology* (RSM) menggunakan desain faktorial dengan 13 perlakuan. Pengujian dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel bebas (konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi) terhadap jumlah kalsium pada tepung tulang. Hasil penelitian didapatkan model linier yang digunakan untuk memprediksi respon. Nilai respon maksimal didapatkan pada ekstraksi dengan 5% NaOH selama 30 menit atau 11,64% HCl selama 58 menit. Hasil verifikasi perlakuan didapatkan jumlah kalsium 15,74-17,46% dengan tingkat keakurasian lebih dari 87,5%. Proses ekstraksi kalsium dengan 5% NaOH selama 30 menit menghasilkan tepung dengan rendemen dan derajat putih tertinggi dengan rasio Ca/P 3:1. Protein dan kadar air yang rendah memungkinkan tepung tulang lele memiliki daya simpan yang lama.

Kata kunci: HCl, kalsium, NaOH, *Response Surface Methodology*, tulang lele

Abstract

This study was designed to determine the optimum conditions on catfish bone calcium extraction through *Response Surface Methodology* (RSM) which used factorial design and 13 treatments. Tests were used to know the influence of independent variables (solvents concentrations and treatment time) on the calcium content of bone flour. As a result, linear models were used as response prediction. Maximum response was obtained by calcium extraction using 5% NaOH during 30 minutes or 11.64% HCl within 58 minutes. It is shown that calcium content were 15.74-17.46% with more than 87.5% accuracy level. Calcium extraction using 5% NaOH during 30 minutes produced flour which has Ca/P ratio 3:1, maximum yield and whiteness level. Low protein and moisture content might result in the long shelf life of catfish bone flour.

Keywords : HCl, calcium, NaOH, *Response Surface Methodology*, catfish bone

Pendahuluan

Lele (*Clarias batrachus*) merupakan salah satu produk perikanan unggulan dengan nilai ekonomi yang tinggi. Secara nasional, produksi lele di Indonesia terus meningkat seiring dengan tingginya permintaan pasar. Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan (2012), tahun 2008 jumlah produksi lele sekitar 6.365 ton dan di tahun berikutnya naik menjadi 7.902 ton serta pada tahun 2010 sebesar 21.539 ton. Bahkan menurut Pusat Data, Statistik dan Informasi, Kementerian Kelautan dan Perikanan (2015) rata-rata produksi lele di Indonesia meningkat dari 543.774 ton pada tahun 2013 menjadi 679.379 ton pada tahun 2014.

Selama ini potensi pemanfaatan lele yang banyak dikaji adalah pengolahan daging lele, padahal pemanfaatannya tidak hanya terbatas pada daging saja, namun juga limbah yang dihasilkan. Dalam pengolahannya, sisa olahan berupa bagian kepala,

insang, organ pencernaan (*viscera*), kulit serta tulang. Hingga saat ini beberapa penelitian pemanfaatan limbah olahan lele sudah dilakukan, seperti pemanfaatan kulit untuk pembuatan gelatin (Sanaei *et al.*, 2013) dan *viscera* untuk pembuatan hidrolisat protein (Klomklao *et al.*, 2013).

Produksi lele yang tinggi di Jawa Barat (Kabupaten Bogor dan Indramayu), Jawa Tengah (Kabupaten Banyumas, Sukoharjo, Boyolali, dan Purbalingga), Jawa Timur (Kabupaten Tulung Agung dan Jombang) dan D.I. Yogyakarta (Kabupaten Sleman dan Kulonprogo) menyebabkan potensi distribusi dan konsumsi yang luas. Meskipun persentase pengolahan hanya 2% dari total produksi, pengolahan lele memiliki margin pemasaran yang tinggi (Triyanti & Shafitri, 2012). Pada industri pengolahan lele, sebanyak 23,43-37,3% berat total ikan merupakan limbah tulang dan kepala yang tidak dimanfaatkan secara optimal. Padahal tulang lele memiliki kandungan kalsium yang

cukup tinggi, yaitu sebesar 5,68% dan fosfor sebesar 3,78%. Selain itu tulang lele memiliki tekstur yang padat dan berwarna putih kecokelatan (Ferazuma *et al.*, 2011). Berdasarkan data produksi lele tahun 2014 (Pusat Data, Statistik dan Informasi, Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2015) sebanyak 5.027,40 kg tulang lele dihasilkan sebagai limbah sisa hasil olahan. Limbah tulang dan kepala lele berpotensi untuk dimanfaatkan pada bahan pangan, terutama sebagai sumber kalsium.

Eksplorasi pemanfaatan tulang lele dimaksudkan untuk meningkatkan nilai tambah (*value added*) baik dari segi nilai ekonomis maupun macam barang yang dihasilkan dalam rangka mencapai *zero waste management*. Pemanfaatan tulang lele sebagai sumber kalsium dapat dilakukan dengan pembuatan tepung tulang. Ferazuma *et al.* (2011) dan Sari *et al.* (2013) menyatakan bahwa tepung tulang lele dapat dibuat melalui metode perebusan dan pengeringan, namun metode perebusan menyebabkan tepung tulang memiliki sifat fisik yang kurang stabil dan mudah terpisah. Diduga hal ini disebabkan oleh proses perebusan yang belum sepenuhnya menghilangkan protein, lemak dan pigmen pada tulang. Ekstraksi kalsium dapat dilakukan dengan larutan asam (Ratnawati *et al.*, 2011) dan larutan basa (Hemung, 2013). Talib dan Zailani (2017) menjelaskan bahwa alternatif pembuatan tepung tulang dapat dilakukan dengan berbagai pelarut seperti air, asam asetat, asam sitrat, NaOH dan HCl (1:3 b/v). Hasil menunjukkan bahwa pengolahan dengan pelarut NaOH dan HCl memberikan pengaruh lebih baik pada kadar abu, daya serap air dan derajat putih. Sedangkan protein dan vitamin D tidak berbeda nyata antara pembuatan tepung tulang dengan pelarut NaOH maupun dengan pelarut HCl.

Informasi tentang kandungan kalsium sebagai sumber mineral terpenting pada tepung tulang lele perlu untuk diketahui sebagai dasar fortifikasi pada bahan makanan. Kalsium yang terkandung dalam tulang lele dapat diekstraksi dengan pelarut tertentu agar ikatan dengan protein dan senyawa makro lainnya terlepas, namun demikian konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi kalsium perlu diketahui untuk mendapatkan informasi metode ekstraksi yang memberikan hasil tepung tulang lele yang berkualitas. Tujuan penelitian ini adalah menemukan metode ekstraksi kalsium dari limbah tulang lele yang optimum berdasarkan konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi kalsium sehingga didapatkan tepung dengan jumlah kalsium paling tinggi serta karakteristik fisikokimia terbaik.

Bahan dan Metode

Bahan

Tulang dan kepala lele diperoleh dari limbah pengolahan salah satu industri produk-produk olahan lele di Sleman. Bahan disortasi, dicuci bersih, ditempatkan dalam kantong plastik dan disimpan pada suhu -20°C . Bahan kimia yang digunakan adalah NaOH (Merck), HCl (Merck) dan aquadest serta bahan-bahan kimia lain untuk pengujian jumlah kalsium, fosfor, protein, dan kadar air. Alat yang digunakan adalah Oven vakum (EYELA WFO-601 SD), *muffle furnace* (Barnstead Thermolyne 1400), chromameter (Konika Minolta CR 400), destruksi unit (Buchi Digestion Unit K-424), *Atomic Absorbtion Spechtrphotometer* (AAS), spektrofotometer, destilat, Kjehdahl, dan desikator.

Metode

Optimasi dengan metode Response Surface Method

Penelitian ini menggunakan rancangan *Response Surface Method* (RSM) untuk mendapatkan respon metode ekstraksi kalsium yang optimal. Terdapat empat tahap dalam aplikasi RSM (Montgomery, 2001).

Tahap pembuatan rancangan formulasi

Rancangan respon dilakukan melalui program Minitab 14 bertujuan untuk menentukan variabel tetap dan variabel bebas. Variabel tetap terdiri dari jumlah kalsium, sedangkan variabel bebas terdiri dari konsentrasi pelarut sebagai faktor 1 (X_1) dan lama waktu ekstraksi sebagai faktor 2 (X_2) (Tabel 1). Penentuan variabel bebas berdasarkan pada pelarut yang digunakan pada ekstraksi kalsium, yaitu pelarut basa NaOH (modifikasi Trilaksana *et al.*, 2006) dan pelarut asam HCl (Agustini *et al.*, 2011) serta percobaan metode pada sampel tulang lele. Pada hasil percobaan didapatkan data variabel bebas yang perlu untuk diketahui metode ekstraksi kalsium yang optimal. Kandungan kalsium sebagai variabel respon yang dioptimumkan atau variabel tetap (Y).

Tabel 1. Penentuan variabel bebas dan kode perlakuan pada penelitian.

Variabel Bebas	Simbol	Range & level		
		-1	0	+1
Konsentrasi pelarut (%)	X_1	5	10	15
Waktu (menit)	X_2	30	60	90

Tahap pembuatan tepung tulang

Metode ekstraksi kalsium dimulai dengan perebusan sampel pada suhu 100°C selama 10 menit, dilanjutkan dengan ekstraksi kalsium dengan menggunakan HCl

atau NaOH dengan konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi yang telah ditentukan (X_1 , X_2), pencucian sampai dengan pH netral, pengeringan dengan oven suhu 60 °C selama 24 jam dan penepungan. Pada tepung tulang kontrol yang akan digunakan sebagai pembandingan pada proses verifikasi setelah tahapan perebusan dilanjutkan dengan pengeringan dengan oven suhu 60 °C selama 24 jam dan penepungan.

Tahap analisis respon

Variabel respon (Y) yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dan uji lanjut Tukey. Dari pengolahan data menggunakan Minitab 14 *statistical software*, didapatkan model linier yang diuji signifikansinya (*p-value*) dan kesesuaian model regresi (*Lack of fit*). Analisis residual dan normalitas dilakukan untuk memeriksa kecukupan model.

Analisis data

Analisis data dilakukan dengan analisis multiple regresi untuk mendapatkan model optimasi yang dipresentasikan dengan rumus:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_{21} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon$$

Y sebagai estimasi respon, β_0 sebagai parameter konstan, β_1 dan β_2 parameter linier, β_{11} dan β_{22} sebagai parameter variabel kuadrat, β_{12} sebagai interaksi dan ϵ sebagai random error. Berdasarkan hasil olah data menggunakan Minitab, respon permukaan optimum yaitu titik stasioner dan nilai respon optimum ditunjukkan berdasarkan *contour plot* dan *surface plot*.

Penentuan titik stasioner (X_0)

Titik stasioner ditentukan dari nilai-nilai koefisien regresi pada model orde kedua dapat disusun matriks b dan B

$$x_0 = \frac{-B^{-2}b}{a}$$

Nilai respon optimum yang diperoleh dengan titik stasioner di atas adalah :

$$\hat{Y}_0 = b_0 + \frac{1}{2} X_0^T b$$

Analisa karakteristik kimia dan fisik tepung tulang lele

Parameter kimia mencakup kadar protein dan air berdasarkan SNI 01-2354-2006 serta kadar kalsium dan fosfor berdasarkan AOAC (1995). Analisa karakteristik fisik tepung kalsium meliputi penghitungan rendemen (Li *et al.*, 2013), dan derajat putih (Yadav & Jindal, 2007).

Hasil dan Pembahasan

Konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi

merupakan faktor yang mempengaruhi jumlah kalsium yang dihasilkan dalam tepung tulang lele. Talib dan Zailani (2017) menambahkan bahwa pembuatan tepung tulang baik menggunakan pelarut asam maupun basa memberikan hasil tepung tulang dengan kualitas fisik dan kimia yang berbeda dengan pembuatan tepung tulang secara konvensional yaitu melalui perebusan. Penelitian yang dilakukan oleh Hemung (2013) adalah perendaman tulang nila dengan NaOH pada suhu 90 °C selama 1 jam menghasilkan 116,56 mg/L atau 0,01% kalsium sedangkan Ratnawati *et al.* (2011) menggunakan ekstraksi HCl 2 N dengan suhu 60 °C selama 2 jam pada ekstraksi cangkang kerang simping menghasilkan 17,23% kalsium. Lekahena *et al.* (2014) menjelaskan bahwa isolasi kalsium dari tulang nila dengan menggunakan pelarut NaOH atau HCl menghasilkan 20,67-21,48% kalsium, 4,41-5,91% rendemen dan ukuran partikel 235-242 nm. Suptijah *et al.* (2012) menjelaskan bahwa semakin lama proses ekstraksi maka kadar kalsium dan rendemen yang didapat semakin tinggi.

Chow (2001) menjelaskan bahwa kalsium fosfat dapat larut pada NaOH maupun HCl namun tidak membentuk pasangan ion stabil atau garam tak larut kalsium atau fosfat. Diduga kondisi tersebut berkaitan dengan proses demineralisasi yang dapat melarutkan mineral termasuk kalsium fosfat pada tulang. Namun demikian Figueiredo *et al.* (2011) menyatakan bahwa terdapat suatu titik kondisi dimana semakin tinggi konsentrasi pelarut (> 1 N) maka koefisien difusi menurun yang menyebabkan semakin tingginya tekanan friksi dan menurunnya laju demineralisasi. Titik kritis tersebut perlu diketahui sebagai dasar ekstraksi kalsium pada tulang lele, dimana memanfaatkan pelarut dengan konsentrasi yang tinggi untuk mereduksi kandungan protein, lemak dan air. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi kedua faktor, yaitu konsentrasi pelarut (X_1) dan lama waktu ekstraksi (X_2).

Model Response Surface Methods

Sebanyak 13 perlakuan (X_1 , X_2) telah dievaluasi dan hasil variabel tetap (Y) pada tiap-tiap perlakuan baik pada perlakuan ekstraksi tepung tulang lele menggunakan pelarut HCl maupun NaOH diperlihatkan pada Tabel 2. Selanjutnya data diolah menggunakan software Minitab 14 untuk menentukan rumus model linier kuadrat. Untuk validasi model prediksi dilakukan validasi melalui metode grafik dan numerik. Metode grafik yang digunakan adalah uji residual yang didefinisikan sebagai perbedaan antara nilai hasil observasi dengan nilai *fit*. Pada uji residual menunjukkan bahwa model terdistribusi normal.

Kandungan kalsium pada tepung tulang dengan metode ekstraksi dengan pelarut 5-15% HCl selama

Tabel 2. Kandungan kalsium (Response Y) pada perlakuan ekstraksi kalsium dengan pelarut HCl dan NaOH.

Kode Sampel	Kode Variabel		Response Y (%)	
	X_1	X_2	ekstraksi dengan HCl	ekstraksi dengan NaOH
N1	-1,000	-1,000	3,34	17,46
N2	-1,000	-1,000	2,17	13,82
N3	-1,000	1,000	1,66	10,18
N4	1,000	1,000	1,62	17,86
N5	-1,414	0,000	9,76	19,28
N6	1,414	0,000	11,20	14,65
N7	0,000	-1,414	9,90	17,42
N8	0,000	1,414	12,30	13,46
N9	0,000	0,000	15,38	14,77
N10	0,000	0,000	13,82	16,11
N11	0,000	0,000	16,48	15,15
N12	0,000	0,000	15,74	19,81
N13	0,000	0,000	9,45	17,46

Y : Kandungan kalsium (%), X_1 : waktu ekstraksi (menit), X_2 : konsentrasi pelarut (%)

Tabel 3. Estimasi koefisien kuadrat pada perlakuan ekstraksi dengan pelarut NaOH dan HCl berdasarkan uji t.

Estimasi Koefisien Kuadrat	Ekstraksi dengan pelarut NaOH			Ekstraksi dengan pelarut HCl		
	Koefisien	Nilai t	Nilai P	Koefisien	Nilai t	Nilai P
Constant	16,72	16,63	0,00	14,24	6,17	0,00
Waktu	-0,33	-0,41	0,69	0,10	0,05	0,96
Konsentrasi	-1,12	-1,40	0,20	0,14	0,08	0,94
Waktu*Waktu	-0,19	-0,23	0,83	-4,01	-2,05	0,08
Konsentrasi*Konsentrasi	-0,95	-1,11	0,30	-3,70	-1,89	0,10
Waktu*Konsentrasi	2,84	2,52	0,04	0,28	0,11	0,92

$P < 95\%$ berpengaruh secara signifikan.

30-90 menit berkisar antara 1,62-16,48% sedangkan pada perlakuan ekstraksi dengan pelarut NaOH berkisar antara 10,18-19,81%. Ekstraksi kalsium dengan 10% pelarut selama 60 menit menghasilkan jumlah kalsium tertinggi yaitu 16,48% pada pelarut HCl dan 19,81% pada pelarut NaOH.

Hasil uji ANOVA

Berdasarkan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk respon jumlah kalsium pada tepung tulang lele hasil ekstraksi dengan NaOH pada perlakuan ekstraksi dengan NaOH, model regresi tidak berpengaruh signifikan terhadap respon jumlah kalsium yang didapat ($P > 0,05$), namun interaksi antara konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi ($P < 0,05$) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon pada tingkat probabilitas 95%. Sedangkan dari hasil analisis varians, ada dua uji untuk memeriksa uji signifikansi yaitu uji simultan dan uji *lack of fit*. Nilai *P-value* untuk uji *lack of fit* didapatkan $0,348 > 0,05$, yang mengindikasikan bahwa model dapat

mendeskripsikan data respon kalsium sehingga dapat disimpulkan bahwa model yang didapat cocok digunakan untuk memprediksikan kondisi proses ekstraksi yang menghasilkan kandungan kalsium yang optimum. Sedangkan pada tepung tulang lele hasil ekstraksi kalsium dengan pelarut HCl, baik model regresi maupun interaksi antara konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi juga tidak berpengaruh signifikan terhadap respon jumlah kalsium yang didapat ($P > 0,05$).

Hasil uji ANOVA dilanjutkan dengan uji t yang diperlihatkan pada Tabel 3. Pada uji t, koefisien kuadrat sebagai konstanta model linier didapatkan berdasarkan koefisien konstant, waktu ekstraksi (X_1), konsentrasi pelarut (X_2) dan interaksi antara waktu dan konsentrasi ($X_1 X_2$).

Koefisien linier baik waktu ekstraksi maupun konsentrasi pelarut pada ekstraksi kalsium menggunakan pelarut NaOH tidak berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah kalsium yang

Tabel 4. Model linier metode ekstraksi kalsium menggunakan NaOH atau HCl dan hasil uji ANOVA.

Metode Ekstraksi	Model	Uji ANOVA		
		Signifikansi (P<0,05)	Lack of fit (P<0,05)	R ²
Pelarut NaOH	$Y = 16,72 - 0,33(X_1) - 1,12(X_2) - 0,19(X_1^2) - 0,95(X_2^2) + 2,84(X_1X_2)$	0,040	0,348	58,2%
Pelarut HCl	$Y = 14,24 - 0,10(X_1) - 0,14(X_2) - 4,01(X_1^2) - 3,70(X_2^2) + 0,28(X_1X_2)$	0,916	0,05	49,7%

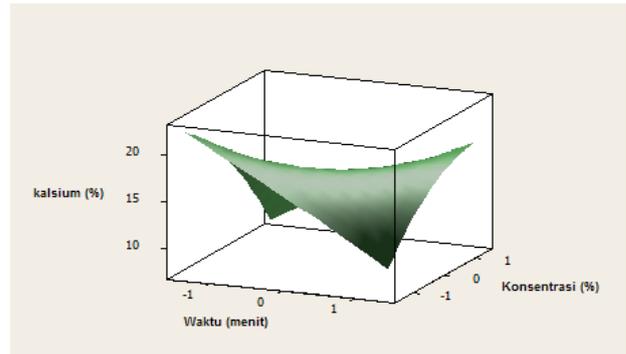
dihasilkan (P>0,05), namun interaksi antara waktu dan konsentrasi berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah kalsium yang dihasilkan (P<0.05). Model regresi linier metode pemisahan kalsium menggunakan pelarut NaOH atau HCl berdasarkan estimasi koefisien kuadrat dan hasil uji ANOVA diperlihatkan pada Tabel 4.

Tabel menunjukkan kode Y, X₁ dan X₂ berturut-turut adalah kandungan kalsium tepung tulang lele (%), waktu ekstraksi (menit) dan konsentrasi pelarut (%). Model regresi sekunder memperlihatkan bahwa jumlah kalsium yang didapatkan pada tepung tulang lele dipengaruhi oleh interaksi antara konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi, yang ditunjukkan pada konstanta positif pada model.

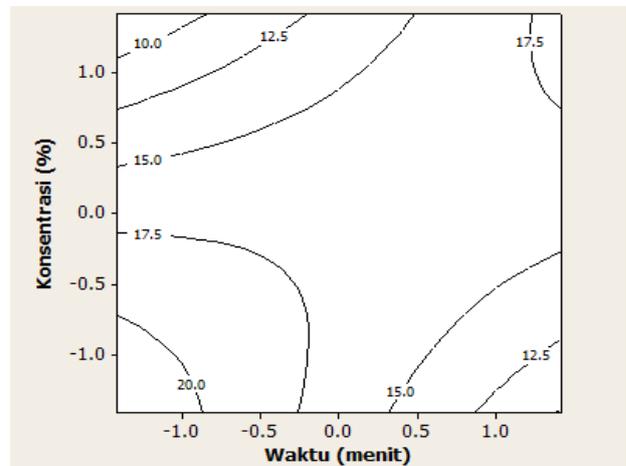
Kondisi respon optimum

Kondisi optimal untuk mendapatkan tepung tulang dengan kandungan kalsium paling tinggi yaitu 15,93% diestimasi dapat dicapai pada ekstraksi dengan 7,6% NaOH selama 46,5 menit. Pada perlakuan ekstraksi kalsium dengan menggunakan HCl didapatkan kondisi optimal yaitu pada perlakuan 11,64% HCl selama 58 menit, dengan estimasi jumlah kalsium yang didapatkan adalah 14,04%. Gambar 1 menunjukkan tiga dimensional respon surface pada variabel tetap yang diplotkan dengan dua variabel bebas (konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi) yang diolah dengan menggunakan software Minitab.

Berdasarkan gambar plot permukaan respon tersebut dapat dilihat bahwa karakteristik yang dimiliki titik stasioner pada percobaan ekstraksi tepung tulang menggunakan NaOH adalah titik pelana. Grafik menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kalsium tepung tulang hasil ekstraksi belum optimal. Pada kondisi ini respon optimal berdasarkan suhu dan waktu ekstraksi tidak terpenuhi sehingga dilakukan analisis lanjutan yaitu respon *contour plot* (Gambar 2).



Gambar 1. *Response Surface* menunjukkan pengaruh perbedaan konsentrasi pelarut NaOH dan waktu ekstraksi terhadap jumlah kalsium.

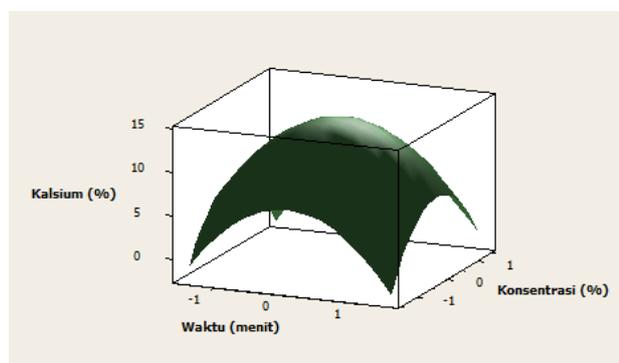


Gambar 2. *Response Contour Plot* menunjukkan pengaruh perbedaan konsentrasi pelarut NaOH dan waktu ekstraksi terhadap jumlah kalsium.

Berdasarkan Gambar 2 dapat disimpulkan bahwa nilai respon maksimal yaitu kandungan kalsium tepung tulang sebanyak 20 % didapatkan pada ekstraksi NaOH dengan konsentrasi pelarut NaOH X₁=-1 (5%) dan waktu X₂=-1 (30 menit). Kondisi optimal tersebut menunjukkan bahwa proses ekstraksi kalsium optimal dilakukan dengan pelarut 5% NaOH selama 30 menit. Peningkatan konsentrasi pelarut atau lama waktu

ekstraksi tidak memberikan respon positif terhadap peningkatan jumlah kalsium.

Dibandingkan dengan pendekatan satu variabel dimana tidak dapat mendeteksi frekuensi interaksi antara dua atau lebih faktor, RSM merupakan metode yang dapat dipilih untuk mengetahui kondisi optimal yang dipengaruhi oleh interaksi antar variabel. Kondisi optimal jumlah kalsium maksimal hasil ekstraksi dengan pelarut HCl yaitu pada koordinat *central point* dimana *slope* maksimal mendekati titik nol, yaitu ekstraksi dengan 10% HCl selama 60 menit. Hal ini sesuai dengan optimasi model regresi yang menunjukkan bahwa nilai respon maksimal yaitu lebih dari 14,4% kalsium didapatkan pada ekstraksi 11,64% HCl selama 58 menit.



Gambar 3. *Response Surface* menunjukkan pengaruh perbedaan konsentrasi pelarut HCl dan waktu ekstraksi terhadap jumlah kalsium.

Uji verifikasi

Untuk mengkonfirmasi prediksi kondisi optimum konsentrasi pelarut dan lama waktu ekstraksi, maka dilakukan eksperimen perlakuan. Berdasarkan nilai prediksi *Response Surface Methods* untuk optimasi metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut NaOH dan HCl, dilakukan verifikasi yaitu perlakuan ekstraksi menggunakan 5% NaOH selama 30 menit (P1), Ekstraksi menggunakan 11,64% HCl selama 58 menit (P2) dan perlakuan kontrol tepung tulang

tanpa ekstraksi (P3) dengan ulangan perlakuan masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (Wahyuni *et al.*, 2002). Hasil uji verifikasi model linier untuk proses ekstraksi kalsium dengan pelarut NaOH, Pelarut HCl dan perlakuan kontrol (tanpa ekstraksi) diperlihatkan pada Tabel 5.

Pada verifikasi model, didapatkan hasil kandungan kalsium tepung tulang pada ekstraksi menggunakan 5% NaOH selama 30 menit sebesar $17,46 \pm 0,01\%$ dengan tingkat keakurasian 87,5% dibandingkan dengan prediksi. Pada perlakuan ekstraksi kalsium dengan menggunakan pelarut 11,64% HCl selama 58 menit didapatkan kalsium sebesar $15,74 \pm 0,09\%$ dengan keakurasian 91,4%. Nilai akurasi uji kalsium yang tergolong tinggi menunjukkan bahwa model yang digunakan pada penelitian cocok. Pada ekstraksi kalsium dengan pelarut HCl jumlah kalsium akan meningkat pada kondisi optimum (11,64% HCl selama 58 menit ekstraksi). Jumlah kalsium akan menurun kembali seiring dengan peningkatan konsentrasi pelarut HCl dan waktu ekstraksi. Hal ini disebabkan oleh semakin terbukanya matriks tulang sehingga proses ekstraksi justru menyebabkan laju demineralisasi meningkat sehingga mereduksi sejumlah kalsium pada tulang Figueiredo *et al.* (2011).

Berdasarkan uji ANOVA, perlakuan ekstraksi memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap jumlah kalsium, fosfor, protein, kadar air, derajat putih dan rendemen yang dihasilkan. Pada uji fosfor perlakuan NaOH dengan kontrol tidak berbeda nyata. Pada perlakuan kadar air tidak berbeda nyata antar perlakuan.

Kandungan fosfor yang dihasilkan pada tepung tulang baik pada perlakuan ekstraksi maupun tanpa ekstraksi yaitu 5,13-6,20%. Rasio kalsium dan fosfor tepung tulang adalah 3:1 (Ca/P) baik pada tepung tulang ekstraksi dengan NaOH maupun tepung tulang tanpa ekstraksi. Agustini *et al.* (2011) menjelaskan bahwa penyerapan kalsium pada makanan perlu diimbangi dengan asupan fosfor dengan rasio Ca/P 3:1. Pada tepung tulang hasil ekstraksi menggunakan HCl didapatkan rasio 2.5:1

Tabel 5. Hasil verifikasi model linier pada proses ekstraksi kalsium.

Karakteristik mutu	NaOH (5%, 30 menit)	HCl (11%, 58 menit)	Kontrol (tanpa ekstraksi)
Prediksi kalsium (%)	20%	14,4%	-
Kalsium (%)	$17,46 \pm 0,01$	$15,74 \pm 0,09$	$16,30 \pm 0,18$
Fosfor (%)	$5,40 \pm 0,03$	$6,20 \pm 0,01$	$5,13 \pm 0,01$
Protein (%)	$12,35 \pm 0,03$	$31,13 \pm 2,12$	$20,63 \pm 1,14$
Kadar Air (%)	$6,15 \pm 0,01$	$6,40 \pm 0,01$	$6,20 \pm 0,02$
Derajat Putih (%)	$88,78 \pm 0,18$	$82,07 \pm 0,36$	$77,67 \pm 0,02$
Rendemen (%)	$64,89 \pm 0,78$	$19,25 \pm 0,81$	$50,45 \pm 1,26$

(Ca/P). Hal ini disebabkan karena rendahnya jumlah kalsium yang dihasilkan pada proses ekstraksi menggunakan pelarut HCl. Mahmoud *et al.* (2007) menjelaskan bahwa perendaman dengan HCl yang cukup lama dapat menyebabkan terbukanya matriks tulang sehingga memudahkan pelepasan kalsium dan mineral lainnya.

Nilai rata-rata kadar protein tertinggi tepung tulang lele yaitu $31,13 \pm 12,35\%$ diperoleh pada perlakuan ekstraksi dengan pelarut HCl, sedangkan kadar protein terendah dihasilkan pada tepung tulang hasil ekstraksi menggunakan NaOH, yaitu $12,35 \pm 0,03\%$. Protein akan terhidrolisis apabila dicampurkan dengan alkali kuat atau enzim proteolitik melalui proses pemecahan protein secara bertahap menjadi molekul-molekul peptida yang sederhana dan asam-asam amino. Ekstraksi menggunakan larutan menyebabkan penarikan senyawa protein, pigmen dan lemak selama pengolahan sehingga memungkinkan memberikan warna yang lebih cerah dan mencegah oksidasi lemak pada tepung tulang yang dihasilkan. Meskipun demikian, Hemung *et al.* (2013) menjelaskan bahwa perlakuan ekstraksi tidak dapat sepenuhnya menghilangkan protein. Hal ini disebabkan masih adanya protein stroma yang tidak larut pada asam maupun basa.

Kadar air pada tepung tulang lele tergolong rendah, yaitu berkisar antara 6,15-6,40%. Nilai kadar air sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh SNI 2715:2013 untuk kadar air tepung tulang yaitu maksimal 10%. Pada kondisi tersebut molekul air yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air lainnya akan berkurang. Proses pengeringan dengan oven suhu 60 °C selama 24 jam dapat menurunkan kadar air pada tulang. Kadar air sangat berpengaruh terhadap stabilitas tepung tulang selama penyimpanan. Kadar air yang tinggi merupakan faktor pertumbuhan mikrobia penyebab kerusakan bahan pangan serta memicu terjadinya agregasi atau penggumpalan pada tepung.

Tepung tulang hasil ekstraksi dengan pelarut NaOH maupun HCl memiliki nilai derajat putih >80%, menunjukkan bahwa warna dan kecerahan tepung tulang hasil ekstraksi hampir menyerupai derajat putih tepung terigu yang berkisar antara 80-90%. Faktor yang mempengaruhi derajat putih adalah komponen organik dalam bahan seperti lemak dan protein. Tepung tulang hasil ekstraksi dengan pelarut NaOH memiliki derajat putih yang paling tinggi, yaitu 88,78%. Sebaliknya jumlah protein yang tersisa pada tepung tulang hasil ekstraksi dengan pelarut NaOH terbukti paling rendah yaitu 12,35%. Hal ini mengindikasikan bahwa NaOH dapat melarutkan lebih banyak senyawa protein, pigmen dan lemak

yang memberikan pengaruh warna tepung yang lebih putih. Pada tepung tulang tanpa ekstraksi nilai kadar air sebesar 77,67%. Hal ini menunjukkan bahwa masih adanya kandungan pigmen dan lemak pada tepung tulang.

Hasil uji rendemen menunjukkan adanya peningkatan rendemen tepung tulang dengan jumlah tertinggi yaitu 64,89% didapatkan pada perlakuan ekstraksi kalsium melalui ekstraksi dengan pelarut 5% NaOH dengan lama waktu ekstraksi selama 30 menit. Ekstraksi kalsium dengan pelarut 11,64% HCl selama 58 menit menghasilkan rendemen tepung tulang paling sedikit yaitu sebesar 19,25%. Konsentrasi HCl yang tergolong tinggi, yaitu 11% dengan lama waktu perendaman 60 menit menyebabkan semakin banyaknya matriks tulang yang terbuka, sehingga banyak komponen mineral ikut terlarut dalam pelarut HCl.

Kesimpulan

Desain faktorial menggunakan *Response Surface Method* (RSM) dapat menentukan kondisi optimal pada proses ekstraksi kalsium. Model statistik yang dikembangkan telah dikonfirmasi dengan uji verifikasi yang memberikan hasil akurasi sebesar lebih dari 87,5%. Penggunaan pelarut 5% NaOH selama 30 menit memberikan kualitas fisik dan kimia yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut HCl ataupun pembuatan tepung tulang lele tanpa ekstraksi. Ekstraksi kalsium dengan pelarut NaOH menghasilkan jumlah kalsium sebesar 17,46%, fosfor 5,40%, protein 12,35%, dan kadar air 6,15%. Proses tersebut juga menghasilkan kualitas fisik terbaik, yaitu rendemen tepung tulang sebesar 64,89% dan derajat putih sebesar 88,78%. Optimasi proses pembuatan tepung tulang lele memungkinkan potensi pengolahan tepung tulang lele skala besar dengan metode yang efektif berdasarkan waktu, jumlah pelarut dan tenaga yang dibutuhkan. Hal ini akan berdampak pada efisiensi biaya pengolahan limbah tulang lele.

Daftar Pustaka

- Agustini, T.W., S.E. Ratnawati, B.A. Wibowo & J. Hutabarat. 2011. Pemanfaatan cangkang kerang simping (*Amusium pleuronectes*) sebagai sumber kalsium pada produk ekstrudat. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 14 (2): 134-142
- Apriyana, I. 2014. Pengaruh penambahan tepung kepala ikan lele (*Clarias* sp.) dalam pembuatan cilok terhadap kadar protein dan sifat organoleptiknya. *Unnes J. of Public Health* 3 (2): 1-9

- Association of Official Agriculture Chemist (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis on the Association of Official Agriculture Chemist. Washington. DC.
- Chow, L.C. 2001. Solubility of Calcium Phosphates. Ed: Octacalcium Phosphate. Monogr Oral Sci. Basel. Karger 18: 94-111.
- Ferazuma, Her., M.S. Anna., Amalia & Leily. 2011. Substitusi tepung kepala ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) untuk meningkatkan kandungan kalsium crackers. J. Gizi dan Pangan 6 (1): 18–27
- Figueiredo, M., S. Cunha, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, H. Figueiredo. 2011. Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. Chemical Engineering Research and Design 89 (1): 116-124.
- Hemung, Bung-Orn. 2013. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on translutaminase assay. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics 3 (4) : 306-309.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2012. Statistik Perikanan Tangkap, Perikanan Budidaya dan Ekspor - Impor Setiap Provinsi seluruh Indonesia, 2003-2010. Pusat Data Statistik dan Informasi, Kementerian Kelautan dan Perikanan.178 hlm.
- Klomkloa, S., S. Benjakul & H. Kishimura. 2013. Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates from toothed ponyfish muscle treated with viscera extract from hybrid catfish. International J. of Food Science and Technology 48 (7): 1483-1489
- Kustiani, A., C.M. Kusharto & E. Damayanthi. 2017. Pengembangan crackers sumber protein dan mineral dengan penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) dan tepung badan-kepala ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Nutri-sains 1 (1): 22-38
- Lekahena, V., D.N. Faridah., R. Syarief & R. Peranginangin. 2014. Karakterisasi fisikokimia nanokalsium hasil ekstraksi tulang ikan nila menggunakan larutan basa dan asam. J. Teknologi Pangan 25 (1): 57-64
- Li, Yun-Fang., Wu-Yu., E.N. Hernandez & P.J. Roberto. 2013. Heat and drought stress on durum wheat: responses of genotypes, yield and quality parameters. J. of Cereal Science 57: 398 – 404
- Mahmoud, N.S., A.E. Ghaly & F. Arab. 2007. Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. American J. of Biochemistry and Biotechnology 3 (1): 1-9
- Montgomery, D.C. 2001. Design and analysis of experiments. New York (US): John Wiley & Sons, Inc.
- Pusat Data Statistik dan Informasi. 2015. Kelautan dan Perikanan dalam Angka tahun 2015. 308 p.
- Ratnawati, S.E., T.W. Agustini & J. Hutabarat. 2014. Penilaian hedonik dan perilaku konsumen terhadap snack yang difortifikasi tepung cangkang kerang simping (*Amusium* sp.). Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada 15 (2): 88-103.
- Sanaei, A.V., F. Mahmoodani., S.F. See., S.M. Yusop & A.S. Babji. 2013. Optimization of gelatin extraction and physico-chemical properties of catfish (*Clarias gariepinus*) bone gelatin. International Food Research Journal 20 (1): 424-430.
- Sari, F.K., D. Ishartani, N.H. Parnanto, C. Anam. 2013. Pengaruh penambahan tulang ikan lele (*Clarias* sp.) dan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kandungan kalsium dan protein pada susu jagung manis (*Zea mays saccharata*). Jurnal Teknosains Pangan 2 (1): 66-72.
- SNI 01-2354.2-2006. Cara uji kimia bagian 2: penentuan kadar air pada produk perikanan. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Suptijah, P., A. Jacob & N. Deviyanti. 2012. Karakteristik dan bioavailabilitas nanokalsium cangkang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*). J. akuatika 3 (1): 63-73.
- Trilaksana, W, S. Ella & N. Muhammad. 2006. Pemanfaatan limbah tulang ikan tuna (*Thunnus* sp.) sebagai sumber kalsium dengan metode hidrolisis protein. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 9 (2) : 34-45.
- Triyanti, Riesti dan N. Shafitri. 2012. Kajian Pemasaran Ikan Lele (*Clarias* sp.) dalam Mendukung Industri Perikanan Budidaya (Studi Kasus di Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah). Jurnal Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan 7 (2): 177-191.
- Yadav, B.K & V.K. Jindal. 2007. Changes in head rice yield and whiteness during milling of rough rice (*Oriza sativa* L.). J. of Food Engineering 86: 113 - 121