

Pengaruh Pemberian Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius Hypophthalmus*) Terhadap Perkembangan Fetus Mencit (*Mus Musculus L.*)

Rahimatul Uthia^{1*}, Ira Oktaviani R¹

Poltekkes Kemenkes Riau, Pekanbaru, Indonesia

*E-mail: rahimatul@pkr.ac.id

Abstrak

Penelitian ini untuk melihat pengaruh tepung tulang Patin (*Pangasius hypophthalmus*) terhadap pertumbuhan janin mencit. Penelitian ini diawali dengan pembuatan tepung tulang Patin dengan menggunakan autoklaf, metode pemanasan bertekanan, kemudian ditentukan tepung proksimatnya. Tepung diformulasi 2% BB dengan memvariasikan dosis dalam kelipatan 2 yang masing-masing disuspensikan ke dalam 0,5% NaCMC, dan satu kelompok kontrol. Tepung tersebut diberikan kepada mencit pada hari ke-6 sampai ke-15 kebuntingan kemudian hanya diberikan dan diminum sampai hari ke-18 hewan diberi makan dan minum saja. Laparotomi dilakukan pada hari ke-18. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tepung terigu berbentuk serbuk halus dan lembut, berwarna putih, tidak berasa/hambar dan berbau sedikit amis. Rendemen tepung adalah 1,75 % kadar air tepung 7,6856 %, kadar abu 51,58 %, karbohidrat 0 %, protein 24,11 %, lemak total 12,75 %; Kalsium 6,124%, Fe $1,38 \times 10^{-4}\%$; Zn $3,614 \times 10^{-3}\%$; P 19,8521%. Dalam pengamatan bobot badan induk, pemberian preparat tes berpengaruh terhadap bobot badan induk ($p < 0,05$), yaitu dosis tepung 0,4 g ($p < 0,05$). Sedangkan pengamatan berat badan janin menunjukkan bahwa pemberian preparat berpengaruh nyata terhadap berat badan janin ($p < 0,05$) dimana dosis yang berpengaruh terhadap peningkatan berat badan janin adalah 0,1 g ($p < 0,05$). Berbeda dengan panjang janin, pemberian preparat tidak berpengaruh nyata terhadap panjang janin ($p > 0,05$). Kerangka janin tidak menunjukkan perubahan yang signifikan, dan organ janin selesai atau tidak ditemukan efek teratogenik.

Kata kunci: *Tepung tulang; Pangasius hypophthalmus; Fetus*

Abstract

This research was to see the effect of Patin (*Pangasius hypophthalmus*) bone flour on the growth of fetal mice. This research began with the manufacture of Patin bone flour by using an autoclave, pressure heating method, and then the flour determined the proximate. Flour was formulated 2% BW by varying the dosage in multiples of 2, each of which was suspended into 0.5 % NaCMC, and one control group. The flours were administered to the mice on the 6th to 15th day of pregnancy then given only and drink until the 18th day the animals were given food and drink only. Laparotomy was performed on the 18th day. The results showed that the flour was in the form of a fine and soft powder, white in color, had no taste/blandness and had a slightly fishy smell. The yield of flour was 11.75 % water content of flour 7.6856 %, ash content of 51.58 %, 0 % carbohydrate, protein 24.11 %, total fat 12.75 %; Calcium 6.124 %, Fe $1.38 \times 10^{-4} \%$; Zn $3.614 \times 10^{-3} \%$; P 19.8521 %. In observing the parent's body weight, giving the test preparation affected the bodyweight of the mother ($p < 0.05$), namely the dose of flour 0.4 g ($p < 0.05$). Meanwhile, observations of fetal body weight showed that the provision of preparations could significantly influence fetal body weight ($p < 0.05$) where the dose that affected increasing fetal body weight was 0.1 g ($p < 0.05$). In contrast to fetal length, the provision of preparations did not significantly affect fetal length ($p > 0.05$). The fetal frame did not show significant changes, and fetal organs were finished or not found teratogenic effects.

Keywords: *Boneflour; Pangasius hypophthalmus; Fetus*

PENDAHULUAN

Provinsi Riau memiliki potensi budidaya air tawar yang sangat besar. Potensi lain yang dimiliki Riau adalah Sungai Kampar, adanya waduk buatan, dan beberapa daerah yang

lahannya cocok untuk pengembangan budidaya ikan patin. Riau merupakan penghasil Patin terbesar keempat di Indonesia, sekitar 27 ton pada tahun 2015 (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016).

Tulang ikan merupakan salah satu limbah pengolahan ikan yang mengandung unsur hara makro dan mikro. Mineral utama dalam tulang adalah kalsium dan fosfor, sedangkan mineral lain dalam jumlah kecil adalah natrium, magnesium, dan fluor. Tulang patin dapat dimanfaatkan dengan mengolahnya menjadi tepung sebagai bahan pangan sumber kalsium dan fosfor (Winarno, 2008). Menurut penelitian Kaya (2008), tepung ikan patin mengandung kalsium 264,53 mg/g, fosfor 88,38 mg/g, protein 22,23%, dan lemak 2,73%, namun kandungan tersebut dapat berubah tergantung kondisi ekologi ikan.

Dilihat dari kandungan tepung tulang ikan Patin yang kaya akan kalsium dan fosfor, sangat erat kaitannya dengan unsur-unsur yang dibutuhkan untuk memerangi stunting yang merupakan masalah terbesar yang dihadapi balita Indonesia. Berdasarkan data Monitoring Status Gizi selama tiga tahun terakhir, stunting memiliki prevalensi tertinggi gangguan gizi seperti gizi kurang, kurus, dan obesitas. Jumlah balita pendek mengalami peningkatan dari tahun 2016 yaitu 27,5% menjadi 29,6% pada tahun 2017 (Kementerian Kesehatan, 2018).

Hasil penelitian Susanto dan Widyaningrum (2013) menunjukkan bahwa komposisi campuran tepung tulang patin berpengaruh terhadap penambahan bobot, panjang, dan kandungan protein ikan patin. Nur et al (2018) juga menguji bihun dengan penambahan tepung tulang Patin untuk penanganan balita stunting.

Pertumbuhan janin dan risiko stunting tidak hanya dipengaruhi oleh nutrisi sebelum dan selama kehamilan tetapi juga setelah melahirkan. Penyebab langsung stunting adalah penyakit infeksi dan asupan makanan yang tidak mencukupi, seperti kekurangan protein dan kalsium. Tulang Patin tinggi protein, kalsium, dan fosfor yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tulang pada balita. Pada penelitian ini diberikan tepung tulang Patin pada mencit bunting untuk melihat pengaruh perkembangan janin terhadap pencegahan stunting.

METODE

Bahan

Penelitian ini menggunakan tulang ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) sebanyak 13,43 kg. Tulang ikan Patin dikumpulkan dari Kampung Patin, Kabupaten Kampar, Riau.

Metode

1. Persiapan tepung

Prosesnya dimulai dengan mencuci tulang dengan air sampai bersih, lalu mengukusnya selama 30 menit. Setelah itu tulang dimasukkan ke dalam autoklaf selama 60 menit pada suhu 121°C sampai tulang menjadi lunak. Selanjutnya tulang digiling dalam blender, oven selama 17 jam pada suhu 70 °C. Kemudian penggilingan dilanjutkan lagi sampai tulang menjadi halus. Tulang yang dihaluskan diayak menggunakan ayakan bertingkat, ayakan 60 dan 80 mesh, untuk menghasilkan tepung tulang Patin. Terakhir ditentukan kadar air, total abu, karbohidrat, lemak total, protein, kalsium, Fe, P, dan Zn tepung tulang Patin.

2. Dosis pemberian

Dosis penggunaan tepung adalah 0,1 g; 0,2 g; dan 0,4 g per kg BB tepung tulang Patin. Dosis berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Susanto & Widyaningrum (2013), pemberian tepung tulang Patin sebanyak 2% dari berat badan hewan uji.

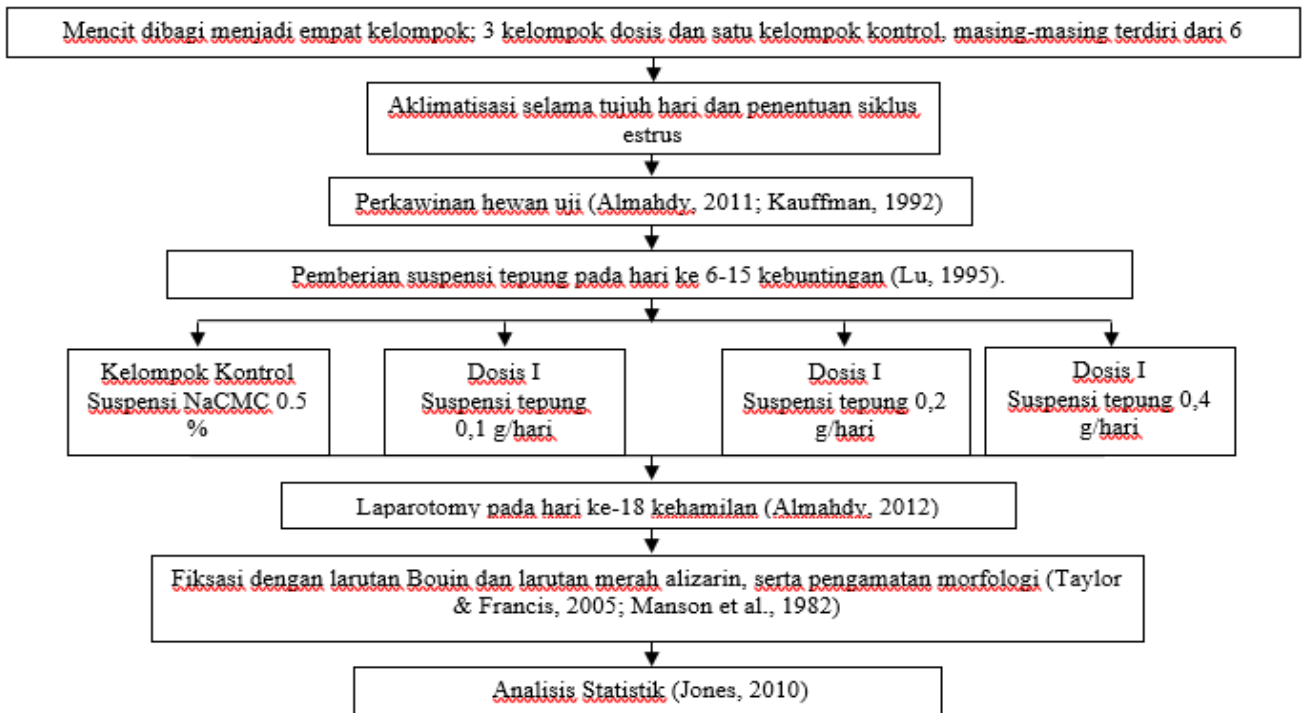
3. Persiapan hewan percobaan

Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina umur 3 bulan, sehat, siklus estrus teratur 4 – 5 hari, belum pernah diberi obat, dan bobot badan sekitar 25 g. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk membiasakan hewan dengan lingkungan baru. Pemberian makanan dan minuman ad libitum, penimbangan berat badan setiap hari, dan perilaku yang diamati. Selama aklimatisasi, siklus estrus ditentukan dengan mengamati secara visual vagina mencit yang menunjukkan vagina berwarna kemerahan dan bergetah. Mencit sehat menunjukkan perubahan berat badan tidak lebih dari 10%, secara visual menunjukkan perilaku normal, dan memiliki siklus estrus 4 – 5 hari (Almahdy et al., 2012).

4. Pengawinan hewan uji

Pada saat estrus, mencit dikawinkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:4. Mencit jantan dimasukkan ke dalam kandang mencit betina pada pukul empat sore dan dipisahkan kembali keesokan harinya. Di pagi hari, sumbat vagina diperiksa. Vagina plug menunjukkan bahwa mencit telah

bersanggama dan berada pada hari kebuntingan 0. Mencit yang bunting dipisahkan dan mencit yang belum kawin dicampur kembali dengan mencit jantan. Pengamatan Pengaruh Tepung Tulang Patin pada Janin Mencit dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.

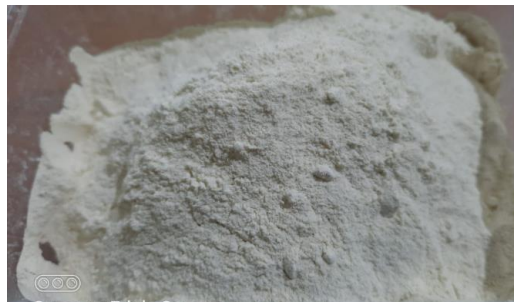


Gambar 1. Skema Kerja Pengamatan Pengaruh Pemberian Tepung Tulang Patin pada Fetus Mencit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tulang Patin yang dikumpulkan dari Kampung Patin sekitar 13,43 kg. Tulang

dipilih dengan tulang yang cukup besar, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Sampel tulang bersih setelah penyortiran adalah 8290 g.



Gambar 2. Tepung Tulang Patin

Organoleptik tepung tulang patin ditunjukkan pada tabel 1. Tepung yang diperoleh berwarna putih kekuningan atau biasa disebut sumsum tulang, warna tersebut diperoleh dengan memperhatikan kebersihan pada proses sortasi tulang. Darah, daging, atau sisa kulit yang masih menempel pada tulang dibuang karena akan menambah derajat kegelapan produk pati yang dihasilkan.

Tepung tulang patin tidak berasa atau hambar namun masih menyisakan sedikit bau amis dari ikan lele. Kesegaran ikan dapat mengukur kadar trimetilamina (TMA) dan amonia. Bau amis berasal dari interaksi

trimetilamina oksida dengan ikatan rangkap lemak tak jenuh yang menghasilkan trimetilamina. Trimethylamine oxide secara alami ada di otot ikan. Pada tahap awal, kecepatan dekomposisi senyawa makromolekul masih rendah, sehingga kandungan TMA masih rendah. Namun, pada akhir proses biokimia daging ikan, senyawa yang menimbulkan bau amis yang tidak sedap seperti trimetilamina dan amoniak tinggi karena penguraian protein yang cepat (Farahita et al., 2012), sehingga di masa mendatang perlu Teknik pengolahan tulang patin bisa dilakukan dengan benar untuk mendapatkan tepung yang tidak berbau amis.

Tabel 1. Organoleptis Tepung Tulang Patin

Parameter	Organoleptis
Bentuk	Serbuk halus, lembut
Warna	Putih Tulang
Rasa	Tidak berasa / hambar
Bau	Agak sedikit berbau amis

Tepung tulang patin dibuat berdasarkan metode yang digunakan oleh Aprilliani (2010) dengan memodifikasi proses perebusan menjadi pengukusan tulang. Cara ini digunakan untuk meminimalkan penyerapan air dalam tulang. Kadar air yang

disajikan pada Tabel 2 adalah 7,6856 % yang diperoleh dari tiga kali pengukuran berulang, yang menyatakan bahwa tepung masih mengandung 7,6856 % air. Kadar air ini lebih rendah dari acuan maksimum yaitu 8% (BSN, 1992).

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Kandungan Kimia Tepung Tulang Patin

Parameter	Kadar (%)
Air	7,6856
Abu	51,58
Karbohidrat	0
Protein	24,11
Lemak Total	12,75
Kalsium	6.124
Fe	1.38×10^{-4}
Zn	3.614×10^{-3}
Fosfor	19,8521

Kadar abu tepung tulang Patin adalah 51,58%. Kadar abu yang tinggi menunjukkan bahwa tepung mengandung lebih dari 50% mineral. Kadar abu yang diperoleh dalam pembuatan tepung tulang Patin cukup tinggi.

Namun jika dibandingkan dengan penelitian lain, kadar abu yang diperoleh dari tepung tulang masih lebih kecil. Diantaranya, Talib et al (2014) menunjukkan kadar abu tepung tulang ikan tuna sebesar 56,65%, Afrinis et al

(2018) juga 64,23% tepung tulang Patin, Hemung (2013) dan Anggraeni et al (2016)

pada tepung tulang ikan tuna. Tulang ikan nila masing-masing 75,83% dan 78,82%.

Tabel 3. Perbandingan beberapa kandungan Tepung Tulang

Parameter	% (hasil penelitian)	% (Afrinis et al., 2018)	% (Kaya, 2008)	% (Tepung Tulang dari ISA, 2002)
Carbohidrat	0	-	-	23,5
Protein	24.11	20.39	22,23	34,2
Lemak Total	12.75	3.36	2,73	5,6
Calcium	6.124	1.002	2.65×10^{-2}	11.9
Fe	1.38×10^{-4}	-	-	-
Zn	3.614×10^{-3}	-	-	-
P	19.8521	0,012	88,38	11,6

Tidak ada kandungan karbohidrat yang ditemukan pada pengujian karbohidrat pada tulang tepung ikan lele. Berbeda dengan tepung tulang ikan yang diproduksi oleh ISA (2002) menyatakan bahwa terdapat 23,5% karbohidrat, tetapi tidak dinyatakan sebagai tepung tulang Patin. Karbohidrat adalah senyawa yang tersusun atas ikatan atom karbon, hidrogen, dan oksigen dengan rumus $C_nH_{2n}O_n$ yang merupakan sumber bahan bakar untuk pembentukan energi. Karbohidrat menyediakan sekitar 4 kkal energi/g. Setelah makan, hampir semua karbohidrat memasuki aliran darah melalui saluran pencernaan sebagai transportasi molekul glukosa 6-karbon ke semua jaringan. Proses penggunaan glukosa ke dalam otot rangka atau hati memiliki dua tujuan akhir, memasuki jalur metabolisme untuk sintesis ATP (glikolisis) atau penyimpanan dalam sitoplasma sel sebagai glikogen. Glikogen otot rangka dipecah dan digunakan untuk sintesis ATP selama latihan intensif, sementara glikogen hati dipecah menjadi glukosa dan dilepaskan ke dalam sirkulasi untuk mempertahankan kadar glukosa darah. Sekitar 2000 kkal (500 g) molekul glukosa disimpan sebagai glikogen otot, dan 500 kkal (125 g) sebagai glikogen hati (Widmaier et al., 2013). Dari uraian di atas, jelas bahwa tulang bukanlah tempat penyimpanan karbohidrat di dalam tubuh.

Protein yang terkandung dalam tulang umumnya dikategorikan ke dalam protein stroma. Protein stroma ini tahan terhadap

larutan asam dan basa (Li et al., 2013). Kandungan protein dalam tulang ikan meningkat seiring dengan pertumbuhan ikan (Hemung, 2013). Kandungan protein pada tepung tulang ikan lele yang diperoleh pada penelitian ini cukup besar. Protein berperan penting dalam pembentukan dan pemeliharaan sel-sel yang mendukung pertumbuhan janin. Sekitar 70% protein hilang untuk kebutuhan janin.

Standar Nasional Indonesia (BSN, 1992) menetapkan kadar lemak tepung tulang ikan untuk kualitas 1 adalah 3%, dan kualitas 2 adalah 6%. Mengacu pada standar tersebut, kandungan lemak tepung tulang Patin jauh lebih besar dari standar. Kandungan rendah lemak membuat kualitasnya relatif lebih stabil dan tidak mudah rusak. Kandungan lemak yang tinggi dapat menyebabkan tepung berasa ikan (Almatsier, 2004). Lemak ditemukan dalam matriks tulang, yang terdiri dari banyak sendi. Bahkan lemak ini tidak dapat dilepaskan dengan mudah, karena kompleks, dan sulit dihilangkan hanya dengan merendam tulang dalam larutan basa (Hemung 2013). Kandungan lemak dalam tulang berhubungan dengan lemak tubuh masing-masing spesies. Biasanya ikan besar dan dewasa tinggi lemak. Asam lemak ikan merupakan asam lemak tak jenuh. Asam lemak pada tepung tulang ikan pada beberapa spesies ditemukan sekitar 80% asam lemak tidak jenuh (Toppe et al., 2007).

Kandungan kalsium yang diperoleh pada tepung tulang sebesar 6,12%, dan

kandungan fosfor sebesar 19,85%. Rasio antara kalsium dan fosfor yang dibutuhkan dalam proses penyerapan. Rasio penyerapan yang tepat membutuhkan kalsium: fosfor dalam rongga usus 1:1 banding 1:3. Rasio kalsium dan fosfor lebih besar dari 1:3 akan menghambat penyerapan kalsium (Sediaoetama, 2006). Pada penelitian ini kandungan kalsium dan fosfornya adalah 1:3,2, sehingga penyerapan kalsium pada janin menjadi tidak optimal.

Bobot induk mencit diamati selama penelitian dan berlangsung sampai hari pembedahan. Bobot induk induk telah dicek menggunakan software pengolah data statistik SPSS 22. Data diperoleh signifikansi normalitas ($p > 0,05$), yang menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Homogenitas tersebut membuat data menjadi tidak homogen ($p > 0,05$). Artinya bobot badan induk termasuk kategori data non parametrik, sehingga dilakukan uji beda dengan uji Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang Patin berpengaruh nyata terhadap bobot badan induk ($p < 0,05$). Kemudian uji statistik lanjutan dilakukan oleh Mann-Whitney. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa dosis 400 mg tepung tulang Patin berpengaruh nyata terhadap bobot badan induk ($p < 0,05$).

Jika dilihat dari data selisih bobot badan induk, terjadi penurunan bobot badan. Namun rata-rata perbedaan bobot badan induk tidak menunjukkan penurunan yang signifikan karena masih ada beberapa induk yang mengalami penambahan bobot badan. Pemberian tepung tulang Patin sebagai nutrisi tambahan tidak berpengaruh terhadap peningkatan berat badan.

Pemberian tepung tulang patin pada mencit bunting tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan bobot badan induk. Bisa jadi dari kandungan karbohidrat tepung tulang tidak tersedia. Namun, ia memiliki kandungan protein dan

lemak yang cukup tinggi. Penurunan berat badan janin pada pemberian tepung mungkin disebabkan oleh pemberian yang dapat membuat tikus stres. Selain diberikan tepung tulang Patin, mencit sebagai hewan uji juga diberi pakan standar.

Selain itu, telah dilakukan pengolahan data statistik terhadap berat badan janin. Dari uji normalitas, data berat badan janin berdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas yang diperoleh signifikan ($p < 0,05$), yang berarti data tidak homogen. Sehingga uji beda dilakukan dengan uji beda kelompok non parametrik dengan Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang Patin berpengaruh terhadap berat badan janin ($p < 0,05$). Kemudian dilakukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan uji Mann-Whitney. The Mann-Whitney menyimpulkan bahwa dosis 100 mg mempengaruhi berat badan janin ($P < 0,05$). Jika dilihat dari data berat badan janin menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang Patin memberikan berat badan janin yang sangat besar dengan dosis 100 mg.

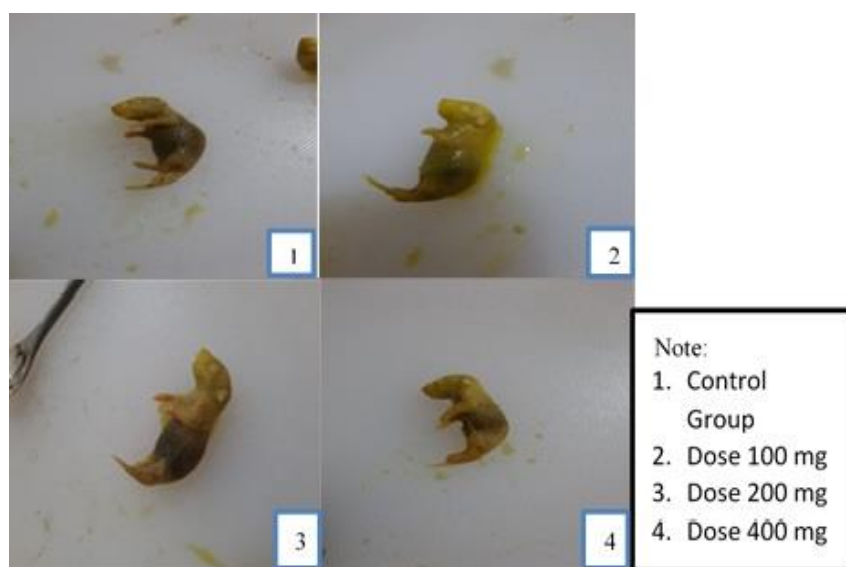
Hasil pengolahan data statistik panjang janin, uji normalitas, dan uji homogenitas menunjukkan bahwa data panjang janin tidak berdistribusi normal dan tidak homogen ($p < 0,05$). Sehingga uji beda dilakukan dengan uji beda kelompok non parametrik dengan Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis menemukan bahwa pemberian tepung tulang Patin tidak mempengaruhi panjang janin ($p > 0,05$). Data statistik menunjukkan tidak ada pengaruh tepung tulang Patin terhadap penambahan panjang janin. Diperkirakan rasio kadar kalsium dan fosfor dari tepung yang digunakan lebih dari 1:3. Rasio kalsium dan fosfor yang lebih besar dari 1:3 akan menghambat penyerapan kalsium (Sediaoetama, 2006), sehingga memungkinkan penyerapan kalsium pada janin menjadi tidak optimal.



Gambar 3. Fetus Mencit Setelah Perendaman dengan Larutan Alizarin

Selain itu, kerangka janin dengan pengamatan langsung tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Terlihat signifikansi dari data panjang janin yang tidak mempengaruhi panjang janin ($p > 0,05$), terlihat pada gambar 3. Selain itu, kelengkapan organ telah dilakukan dengan pengamatan langsung.

Tidak ada janin yang cacat atau organ yang tidak lengkap. Pemberian tepung tulang patin dapat diartikan aman untuk diberikan pada mencit bunting karena tidak menimbulkan teratogen pada janin, terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Fetus Mencit Setelah Perendaman dengan Larutan Bouins'

KESIMPULAN

Pemberian tepung tulang Patin berpengaruh terhadap bobot badan induk (dosis 400 mg), bobot badan janin (dosis 100 mg) tetapi tidak terhadap panjang janin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Poltekkes Kemenkes Riau atas dana penelitian sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

DAFTAR RUJUKAN

- Afrinis, N., Besti, V., Anggraini, H. D. (2018). Formulasi dan Karakteristik Bihun Tinggi Protein dan Kalsium dengan Penambahan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) Untuk Balita Stunting. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 14(2), 157-164.
- Almahdy, A. (2012). *Teratologi Eksperimental*. Padang: Andalas University Press.
- Almahdy, A. (2011). *Uji aktivitas vitamin A terhadap efek teratogen warfarin pada fetus mencit putih*. Medan: USU Press.
- Almatsier S. (2004). *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Anggreni, N., Darmanto, Y. S., Riyadi, P. H. Pemanfaatan Nanokalsium Tulang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) pada Beras Analog dari Berbagai Macam Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 5(4), 114-122
- Aprilliani, I. S. (2010). Pemanfaatan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) Pada Pembuatan Cone Es Krim. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. (1992). SN I01-3158. Tepung tulang untuk bahan baku makanan ternak. Jakarta (ID): Badan Standarisasi Nasional
- Farahita, Y., Junianto., dan Kurniawati, N. (2012). Karakteristik Kimia Caviar Nilem dalam Perendaman Campuran Larutan Asam Asetat dengan Larutan Garam Selama Penyimpanan Suhu Dingin (5-100C). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*: 3 (4), 170
- Hemung B. 2013. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 3(4): 306-309
- [ISA] International Seafood of Alaska. (2002). *Analysis of Fish Meal*. Alaska: USA. Inc. Kodiak.
- Jones, D. S. (2010). *Statistika farmasi*. Penerjemah: H. Rivai. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kauffman, M. H. (1992). *The atlas of Mouse Development*. London: Academic Press Limited.
- Kaya, A. O. W. (2008). "Pemanfaatan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Sebagai Sumber Kalsium Dan Fosfor Dalam Pembuatan Biscuit". Tesis. Bogor: IPB
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2016). *Laporan Kinerja Kementerian Kelautan dan Perikanan 2016*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan
- Kementerian Kesehatan. (2018). *Buku Saku Pemantauan Status Gizi Tahun 2017*. Jakarta: Direktorat Gizi Masyarakat
- Li Z2R, Wang B, Chi CF, Zhang QH, Gong YD, Tang JJ, Luo HY, Ding GF. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloids* 31: 103-113.
- Lu, F.C. (1995). *Toksikologi Dasar (Edisi kedua)*. Penerjemah: E. Nugroho. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Manson, J. M., M, Zenick, H., & costlow, R. D. (1982). *Teratology test methods for laboratory animals*. New York: Raven Press.
- Nur, A., Besti, V., Anggraini, H.D. (2018). Formulasi Karakteristik Bihun Tinggi Protein dan Kalsium dengan Penambahan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) untuk Balita Stunting. *Jurnal MKMI*, 14(2), 157-164.
- Sediaoetama AD. (2006). *Ilmu Gizi Untuk Mahasiswa dan Profesi*. Jilid I. Jakarta. Dian Rakyat.
- Susanto, T.A dan Widyaningrum, T. (2013). Pengaruh Komposisi Campuran Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius Pangasius*) Dan Pelet Terhadap Pertumbuhan Dan Kadar Protein Ikan Lele (*Clarias sp.*). *Jurnal Bioedukatika*, 1(1), 85-94
- Talib A, Suprayitno E, Aulani'am, Hardoko. (2014). Physico-chemical properties of Madidihang (*Thunnus albacares* Bonnaterre) fish bone flour in Ternate, North Moluccas. *International Journal of Biosciences*. 4(10): 22-30.

- Taylor & Francis. (2005). *Principles and Method of Toxicology* (Edisi keempat). USA: Taylor and Francis e-Library.
- Toppe J, Albrektsen S, B Hope, and A Aksnes. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species.
- Comparative Biochemical and Physiology*, 146(B): 395-401
- Widmaier, E., Raff, H., Strang, K., (2013). *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill, Boston
- Winarno, F.G. (2008). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta (ID): PT Gramedia Pustaka