Pangan
Vol. 35, No. 2, Agustus 2026
https://doi.org/10.33964/jp.v35i2.974

ARTIKEL

Pengaruh Waktu Hidrolisis dan Fermentasi terhadap Karakteristik Peptida Kelat Kalsium dari Tulang Ceker Ayam

Effects of Hydrolysis and Fermentation Time on the Characteristics of Calcium-Chelating Peptides Derived from Chicken Feet Bones

Yusran [1], **Arni AR** [2], **Darwis** [3], **Mirdah Aprilia Amir** [1]

[1]Fakultas Pertanian, Peternakan dan Perikanan, Universitas Puangrimaggalatung, Kota Sengkang, Sulawesi Selatan, Indonesia
[2]Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Puangrimaggalatung, Kota Sengkang, Sulawesi Selatan, Indonesia
[3]Fakultas Ilmu Pendidikan, Universitas Puangrimaggalatung, Kota Sengkang, Sulawesi Selatan, Indonesia

OPEN ACCESS

KORESPONDENSI
Yusran
yusranishak006@gmail.com

RIWAYAT ARTIKEL
Diterima: 30 Maret 2026
Direvisi: 16 Juni 2026
Disetujui: 28 Juni 2026
Dipublikasikan: 28 Agustus 2026

HAK CIPTA
© 2026 Penulis.
Artikel ini merupakan artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah lisensi CC BY-NC-SA 4.0.

ABSTRAK
Latar belakang: Tulang ceker ayam merupakan hasil samping yang berpotensi dimanfaatkan sebagai sumber peptida kelat kalsium. Kajian mengenai pengaruh kombinasi hidrolisis enzimatik dan fermentasi terhadap karakteristik peptida kelat kalsium dari bahan tersebut masih terbatas sehingga diperlukan evaluasi kondisi proses yang sesuai.
Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh waktu hidrolisis dan fermentasi terhadap kadar protein kasar dan kadar kalsium pada kelat kalsium yang dihasilkan dari tulang ceker ayam.
Metode: Metode penelitian menggunakan rancangan faktorial 3 × 2 dengan faktor waktu hidrolisis (3, 6, dan 9 jam) dan waktu fermentasi (18 dan 24 jam). Parameter yang diamati meliputi kadar protein kasar, kadar kalsium, dan karakteristik proksimat. Data dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%.
Hasil dan Pembahasan: Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan waktu hidrolisis dan fermentasi menghasilkan perbedaan kadar protein kasar dan kalsium. Kadar protein kasar tertinggi sebesar 40,06±0,03% dan kadar kalsium tertinggi sebesar 3,847±0,02 mg/100g bk diperoleh pada perlakuan hidrolisis 3 jam dan fermentasi 24 jam (H1F2).
Kesimpulan: Variasi waktu proses memengaruhi karakteristik peptida yang dihasilkan dari tulang ceker ayam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi hidrolisis enzimatik dan fermentasi berpotensi dimanfaatkan dalam pengembangan bahan fortifikasi pangan berbasis sumber daya lokal.

KATA KUNCI
Fermentasi; Fortifikasi Pangan; Hidrolisis Enzimatik; Peptida Kelat Kalsium; Tulang Ceker Ayam.

ABSTRACT
Background: *Chicken foot bones are a byproduct with potential for use as a source of calcium-chelating peptides. Studies on the effect of a combination of enzymatic hydrolysis and fermentation on the characteristics of calcium-chelating peptides from this material remain limited; therefore, an evaluation of appropriate process conditions is needed.*
Objectives: *This study aims to evaluate the effects of hydrolysis and fermentation times on crude protein and calcium content in calcium chelates produced from chicken feet bones.*

Methods: *The study employed a 3 × 2 factorial design with hydrolysis time (3, 6, and 9 hours) and fermentation time (18 and 24 hours) as factors. The parameters observed included crude protein content, calcium content, and proximate characteristics. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and followed by Duncan's multiple range test at a 5% significance level.*
Results and Discussion: *The results showed that increasing hydrolysis and fermentation times resulted in differences in crude protein and calcium content. The highest crude protein content of 40.06±0.03% and the highest calcium content of 3.847±0.02 mg/100 g dry weight were obtained in the treatment with 3 hours of hydrolysis and 24 hours of fermentation (H1F2).*
Conclusion: *Variations in processing time affected the characteristics of the peptides produced from chicken feet bones. The results of this study indicate that the combination of enzymatic hydrolysis and fermentation has the potential to be utilized in the development of food fortification ingredientsbased on local resources.*

KEYWORDS
Calcium-Chelating Peptides; Chicken Feet Bones; Enzymatic Hydrolysis; Fermentation; Food Fortification.

1. Pendahuluan

Sekitar 50% masyarakat Indonesia masih memiliki asupan kalsium yang rendah (Kekalih dkk., 2025). Rata-rata konsumsi kalsium orang dewasa dilaporkan hanya sekitar 254 mg/hari, masih jauh di bawah rekomendasi asupan harian sebesar 1.000–1.200 mg/hari (Bardosono dkk., 2020). Kondisi ini dapat memicu berbagai jenis penyakit kronis seperti osteoporosis, kanker usus besar, tekanan darah tinggi, osteomalasia, batu ginjal, dan anggunan kesehatan lainnya (Naghshi dkk., 2022; Siembab dkk., 2025).

Kalsium (Ca) sendiri merupakan unsur mineral yang berperan penting bagi kesehatan manusia, terutama dalam menjaga kekuatan tulang serta mendukung proses metabolisme vital lainnya seperti kontraksi otot, pembekuan darah, sekresi kelenjar dan konduksi saraf (Liao dkk., 2020). Proses biologis normal tubuh manusia melibatkan unsur kalsium sekitar 1,5–2,2% dari total berat badan (Zhang dkk., 2021). Kalsium dalam tubuh manusia bersifat anorganik yang melimpah namun keberadaannya dapat berkurang dan bisa diisi kembali melalui asupan makanan (Zhang & Liu, 2022). Kebutuhan kalsium masyarakat umumnya dipenuhi melalui konsumsi berbagai sumber pangan, seperti sayuran, buah-buahan, susu, telur, dan kacang-kacangan. Sumber kalsium yang umum digunakan seperti kalsium karbonat dan kalsium fosfat memiliki keterbatasan karena mudah membentuk presipitasi di saluran pencernaan sehingga bioavailabilitasnya rendah pula (Zhang dkk., 2021), suplemen berbasis kalsium laktat, kalsium sitrat, dan kalsium glukonat, mudah mengalami pengendapan meskipun memiliki kelarutan yang lebih baik. Di sisi lain, terdapat tulang-belulang yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber kalsium pangan. Namun, sebagian besar tulang masih dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pakan meskipun memiliki kandungan protein dan mineral yang tinggi. Tulang ceker ayam diketahui memiliki potensi sebagai bahan baku sumber kalsium pangan karena mengandung mineral dan protein yang cukup tinggi (Yusran, 2024). Akan tetapi, mineral pada tulang umumnya berada dalam bentuk hidroksiapatit dengan kelarutan rendah dalam saluran pencernaan manusia Muntean dkk., (2024) sehingga membutuhkan modifikasi metode ekstraksi yang tepat.

Kajian mengenai kombinasi hidrolisis dan fermentasi terhadap pembentukan peptida kelat kalsium dari tulang ceker ayam masih terbatas. Metode ini berpotensi mengatasi keterbatasan hidrolisis alkali yang umum digunakan namun kurang efisien sehingga senyawa kalsium masih kompleks. Ekstraksi melalui hidrolisis enzim dapat memecah senyawa kalsium menjadi lebih sederhana. Fermentasi menggunakan bakteri tertentu dapat meningkatkan peptida bioaktif yang berkontribusi dalam meningkatkan mutu dan nilai gizi produk (Taufik dkk., 2018). Metode ini berpotensi menghasilkan peptida yang dapat berperan sebagai pengikat ion kalsium ke dalam sel sehingga mudah diserap (Fan dkk., 2025).

Peptida kelat kalsium merupakan salah satu pendekatan yang banyak dikaji dalam pengembangan sumber kalsium berbasis protein. Kompleks ini memiliki kelarutan yang baik serta mampu meningkatkan stabilitas dan bioavailabilitas kalsium dalam tubuh (Wang dkk., 2020). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa peptida kelat kalsium yang berasal dari berbagai bahan, seperti biji kenari, kacang tanah, kulit ikan, dan biji kemangi lemon, memiliki kemampuan mengikat kalsium dan meningkatkan bioavailabilitas mineral tersebut (Bu dkk., 2024; Dai dkk., 2024; Ding dkk., 2025; Kheeree dkk., 2022).

Penggunaan tepung tulang ceker ayam diharapkan protein yang menempel pada tulang dapat dimanfaatkan mencukupi pembentukan peptida. Kelat kalsium yang kekurangan peptida akan mengurangi daya ikat asam amino sehingga saat kalsium ionik rendah akan menurunkan bioavailabilitas dan bersifat toksik saat konsentrasi ionik kalsium tinggi (Zhang dkk., 2021). Peptida kelat kalsium juga dapat menghambat pembentukan fosfat

Han dkk., (2024) dan senyawa lain yang tidak larut di usus. Ekstraksi tulang ceker ayam menjadi peptida dapat mengatasi keterbatasan kalsium klorida, kalsium karbonat, kalsium hidroksida dan garam kalsium anorganik lainnya yang mudah mengendap sehingga sulit dicerna (Liang dkk., 2016). Oleh karena itu pemanfaatan tulang ceker ayam sebagai sumber peptida bioaktif menjadi pendekatan strategis pengembangan bahan fortifikasi pangan yang mengandung mineral berbasis protein (Islamy dkk., 2024; Muthiah dkk., 2024).

Hidrolisis enzimatik menggunakan papain untuk memecah protein menjadi lebih sederhana dan enzim pepsin untuk mengekstrak kalsium tulang. Selanjutnya difermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* untuk mendapatkan kaldu polipeptida yang kaya bioaktif pengikat ion kalsium. Kemudian direaksikan menggunakan NaOH dan etanol anhidrat untuk menghasilkan peptida kelat kalsium yang larut dalam air, mudah dicerna dan berpotensi dikembangkan sebagai bahan pangan. Proses penyerapan kalsium dibantu peptida yang mengikat kalsium sebagai ligan sehingga proses transpor nutrisi lebih cepat, konsumsi energi rendah serta membentuk kelat stabil yang larut dengan ion kalsium (Zhang & Liu, 2022).

Mineral berbasis protein dinilai memiliki potensi stabilitas lebih baik dibandingkan kalsium anorganik. Penelitian ini difokuskan pada evaluasi pengaruh waktu hidrolisis dan fermentasi terhadap karakteristik peptida kelat kalsium sebagai tahap awal pengembangan sumber fortifikasi kalsium berbasis protein. Berbeda dengan penelitian sebelumnya yang umumnya menggunakan hidrolisis enzimatik tunggal atau bahan baku nabati dan ikan, penelitian ini merupakan upaya awal pengembangan peptida kelat kalsium berbasis tulang ceker ayam melalui kombinasi enzimolisis dan fermentasi sebagai pendekatan yang belum banyak dilaporkan pada bahan baku tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi peptida kelat kalsium dari tepung tulang ceker ayam melalui pendekatan *enzymolysis-fermentation* serta mengevaluasi karakteristik komposisi kimianya sebagai bahan fortifikasi pangan berbasis sumber daya lokal.

2. Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Politeknik Pertanian Negeri Pangkep. Kegiatan penelitian meliputi pembuatan tepung tulang ceker ayam, proses hidrolisis dan fermentasi, serta analisis karakteristik kimia produk yang dihasilkan. Bahan baku penelitian berupa ceker ayam diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) di salah satu pasar tradisional di Kabupaten Wajo, Provinsi Sulawesi Selatan. Enzim papain, enzim pepsin dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* didapatkan dari CV. Intraco Makassar sebagai pusat komersialisasi bahan kimia. Sementara bahan lainnya seperti heksana, asam clorida (HCL 0,4 MOL), etanol anhidrat, media bakteri berupa nutrient broth (NB) dan glukosa serta berbagai sarana produksi disediakan oleh Laboratorium Kimia dan Laboratorium Biologi Politeknik Pertanian Negeri Pangkep.

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan dua faktor, yaitu waktu hidrolisis enzim (3, 6, dan 9 jam) dan waktu fermentasi (18 dan 24 jam). Rentang waktu hidrolisis mengacu pada Wang dkk., (2020) yang efektif menghasilkan peptida pengikat kalsium, sedangkan waktu fermentasi dipilih untuk mengevaluasi aktivitas *Lactobacillus bulgaricus* dalam pelepasan mineral dan pembentukan peptida bioaktif. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali sehingga diperoleh 18 unit percobaan. Tahapan penelitian meliputi produksi tepung tulang ceker ayam, hidrolisis enzimatik, fermentasi hidrolisat enzimatik dan pengeringan beku untuk memperoleh bubuk peptida kelat kalsium.

2.1. Prosedur Pembuatan Tepung Tulang Ceker Ayam

Ceker ayam dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian dimasak menggunakan panci bertekanan selama 1 jam untuk memudahkan pemisahan kulit, daging, kuku, dan jaringan lunak lainnya. Tulang yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tulang bersih yang telah dipisahkan dari sisa daging dan jaringan lunak. Selanjutnya tulang ceker ayam direndam dalam heksana selama 24 jam untuk menghilangkan lemak dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 (b/v). Hasilnya dicuci menggunakan akuades hingga pH netral, ditiriskan dan didekalsifikasi menggunakan HCl 0,4 mol/L dengan perbandingan 1:8 selama 24 jam. Hasilnya dicuci menggunakan akuades sampai pH netral, dikeringkan, dihancurkan menjadi bubuk hasil dekalsifikasi, dan diayak menggunakan ayakan 100 mesh.

2.2. Proses Hidrolisis Enzimatis Tepung Tulang Ceker Ayam

Tepung tulang ceker ayam disuspensikan dalam akuades dengan rasio 1:10 b/v (100 g tepung tulang ceker ayam dan 1000 ml akuades). Suspensi terlebih dahulu dihidrolisis menggunakan enzim papain 0,5% (b/b) pada suhu 55°C dan pH 6 selama waktu yang sesuai dengan perlakuan. Setelah itu, pH larutan disesuaikan menjadi 2,5 dan dilanjutkan dengan penambahan enzim pepsin 0,53% (b/b) pada suhu 40°C. Proses hidrolisis dilakukan selama total waktu perlakuan 3, 6, dan 9 jam. Larutan dipanaskan pada suhu 1000C selama 15 menit untuk menonaktifkan enzim, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 40C untuk memisahkan supernatan yang selanjutnya dikumpulkan.

2.3. Proses Aktivasi dan Fermentasi Mikroba Hidrolisat Enzimatik

Aktivasi mikroba merujuk Wang dkk., (2020) yang dimulai dengan inokulasi bakteri *Lactobacillus bulgaricus* pada media Nutrient Broth cair (121^0C, sterilisasi 15 menit) dengan dosis 1% dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 370C selama 30 jam sebagai starter fermentasi. Inokulasi bakteri diaktifkan 3 generasi sebelum digunakan untuk percobaan utama agar bakteri beradaptasi dan aktif kembali setelah penyimpanan, serta meningkatkan viabilitas dan kestabilannya. Selanjutnya fermentasi dilakukan dengan menambahkan inokulum bakteri hasil inokulasi sebanyak 6% dari total volume substrat kemudian ditambahkan glukosa sebanyak 3% (w/v). Persentase bakteri digunakan lebih besar dari sebelumnya untuk mempercepat proses fermentasi. Selanjutnya fermentasi dilakukan dalam labu Erlenmeyer yang tertutup rapat menggunakan aluminium foil dan penutup ulir sehingga tercipta kondisi anaerob. Seluruh wadah fermentasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C sesuai waktu perlakuan, yaitu 18 dan 24 jam.

2.4. Proses Penyiapan Peptida Kelat Kalsium

Tahapan ini merujuk (Wang dkk., 2020), dimana larutan hasil fermentasi dinetralkan dengan penambahan NaOH hingga kondisi netral. Kemudian ditambahkan etanol anhidrat (perbandingan volume 1:8) secara perlahan setetes demi setetes untuk mengendapkan peptida kelat kalsium dari larutan. Selanjutnya larutan didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang, dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapan dari supernatan. Endapan yang diperoleh dikumpulkan dan dielusi sebanyak tiga kali menggunakan etanol anhidrat untuk menghilangkan kotoran. Selanjutnya, endapan dikeringkan menggunakan *freeze dryer* hingga diperoleh produk dalam bentuk bubuk.

Variabel pengamatan yang diuji dalam penelitian ini meliputi uji proksimat lengkap dan uji kadar kalsium. Pengujian proksimat bubuk peptida kelat kalsium mengacu pada metode standar AOAC 2005 (Horwitz, 2006), meliputi uji kandungan protein dengan metode Kjeldahl (AOAC 992.15), lemak dengan metode Soxhlet (AOAC 920.39), kadar air dengan

metode pengeringan (AOAC 925.10), kadar abu dengan metode pengabuan (AOAC 923.03), dan kandungan karbohidrat menggunakan metode *by difference.* Pengujian kadar kalsium menggunakan metode kompleksometri yang dititrasi dengan larutan standar *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) 0,0100 N (Taufik dkk., 2018).

Perolehan data dianalisis menggunakan program IBM SPSS Statistics versi 26. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) pada taraf kepercayaan 95% (α = 0,05). Apabila terdapat perbedaan nyata, dilakukan uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Analisis ragam dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh faktor waktu hidrolisis dan waktu fermentasi serta interaksi kedua faktor terhadap variabel pengamatan yang diamati. Perlakuan optimum ditentukan berdasarkan kombinasi nilai kadar protein kasar dan kalsium tertinggi yang berbeda nyata secara statistik dibandingkan perlakuan lainnya.

3. Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), interaksi waktu hidrolisis dan fermentasi berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap seluruh variabel yang diamati (kadar air, abu, protein kasar, lemak, karbohidrat dan kalsium). Perbedaan antarperlakuan kemudian diuji menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) yang disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa setiap kombinasi perlakuan memberikan respon yang berbeda terhadap karakteristik produk yang diperoleh.

Tabel 1. Analisis Proksimat Peptida Kelat Kalsium dari Tulang Ceker Ayam (% Berat Basah)

Sampel	Air	Abu	Protein Kasar	Lemak	Karbohidrat
H1F1	1,83±0,02a	12,96±0,02a	24,82±0,03c	1,04±0,04b	59,30±0,01
H2F1	2,03±0,01d	14,15±0,03f	24,76±0,03b	1,05±0,02b	57,98±0,01
H3F1	1,93±0,01bc	13,55±0,02d	23,84±0,02a	0,95±0,02a	59,71±0,02
H1F2	1,92±0,01b	14,36±0,01c	40,06±0,03e	1,02±0,01b	42,62±0,02
H2F2	1,96±0,01c	13,73±0,04e	38,56±0,02d	1,15±0,03c	44,58±0,01
H3F2	1,85±0,02a	13,06±0,02b	38,53±0,03d	1,14±0,02c	45,41±0,01

Sumber: Hasil Penelitian. Data Diolah. 2026.

Keterangan: Nilai dinyatakan sebagai rata-rata ± standar deviasi. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5% ($p<0,05$).

Tabel 2. Kadar Kalsium pada Peptida Kelat Kalsium Tulang Ceker Ayam

Kadar Kalsium (mg/100g bk)			
Waktu Hidrolisis (H)	**Waktu Fermentasi (F)**		**Rata-Rata**
	18 Jam	**24 Jam**	
3 Jam	3,365±0,02e	3,847±0,02f	**3,605**
6 Jam	3,273±0,02d	2,755±0,03c	**3,015**
9 Jam	2,354±0,03b	2,267±0,03a	**2,311**
Rata-Rata	**3,000**	**2,956**	**(+)**

Sumber: Hasil Penelitian. Data Diolah. 2026

Keterangan: Nilai dinyatakan sebagai rata-rata ± standar deviasi. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5% ($p<0,05$).

3.1. Kadar Kalsium

Hasil analisis kalsium pada Tabel 2 menunjukkan bahwa interaksi waktu hidrolisis dan fermentasi memengaruhi kadar kalsium peptida kelat kalsium dari tulang ceker ayam. Kadar kalsium cenderung menurun seiring bertambahnya waktu hidrolisis, sedangkan fermentasi 24 jam menghasilkan kadar kalsium lebih tinggi dibandingkan fermentasi 18 jam. Kadar kalsium tertinggi diperoleh pada perlakuan hidrolisis 3 jam dan fermentasi 24 jam (H1F2) sebesar 3,847±0,02 mg/100 g bk, sedangkan kadar terendah diperoleh pada perlakuan hidrolisis 9 jam dan fermentasi 24 jam (H3F2) sebesar 2,267±0,03 mg/100 g bk.

Perbedaan kadar kalsium ini tidak terlepas dari peran protein yang mengalami hidrolisis menjadi peptida dengan ukuran lebih kecil. Proses hidrolisis enzimatik menghasilkan peptida yang memiliki gugus aktif seperti karboksil dan amino yang berperan dalam mengikat ion kalsium (An dkk., 2022; Walters dkk., 2018). Peptida dengan struktur tertentu mampu membentuk kompleks stabil dengan ion Ca^{2+} melalui mekanisme kelasi, sehingga meningkatkan jumlah kalsium yang terikat dalam sistem (Zhang & Liu, 2022).

Waktu hidrolisis yang relatif singkat pada penelitian ini diduga menghasilkan peptida dengan ukuran dan struktur yang masih sesuai untuk berinteraksi dengan ion kalsium. Sebaliknya, hidrolisis yang terlalu lama dapat menyebabkan degradasi lanjutan menjadi asam amino bebas yang memiliki kemampuan pengikatan kalsium lebih rendah dibandingkan peptida (Cai dkk., 2025). Hal ini menjelaskan penurunan kadar kalsium pada waktu hidrolisis yang lebih panjang. Selain itu, proses fermentasi memberikan kontribusi penting dalam meningkatkan ketersediaan kalsium. Aktivitas mikroorganisme selama fermentasi menghasilkan asam organik yang dapat melarutkan kalsium dari matriks tulang menjadi bentuk ionik (Mousavi & Mousavi, 2021). Ion kalsium yang terlepas kemudian berinteraksi dengan peptida hasil hidrolisis membentuk kompleks peptida kelat kalsium 2 (Hu dkk., 2022; Wang dkk., 2020). Dengan demikian, fermentasi tidak hanya meningkatkan pelepasan kalsium, tetapi juga mendukung pembentukan kompleks kelat yang lebih stabil.

Hasil yang diperoleh dipengaruhi jenis bahan baku dan metode pengolahan. Penelitian Hu dkk., (2022) melaporkan bahwa peptida dari tulang hewan memiliki kemampuan mengikat kalsium yang dipengaruhi oleh struktur yang terbentuk. Demikian Wang dkk., (2020) menunjukkan pembentukan peptida kelat kalsium dari tulang domba sangat dipengaruhi oleh kombinasi proses hidrolisis dan fermentasi. Namun dibandingkan dengan sumber lain seperti ikan dan nabati, nilai kalsium berada pada kisaran sebanding atau cenderung lebih tinggi. Hal tersebut diperoleh akibat komposisi mineral tulang ceker ayam cukup tinggi serta efisiensi proses ekstraksi (Zhai dkk., 2023). Kadar kalsium yang dihasilkan juga sejalan dengan kadar abu sebagai indikator total mineral (Tabel 2), di mana peningkatan kadar abu mencerminkan peningkatan mineral termasuk kalsium (tha dkk., 2019).

Dibandingkan dengan sumber kalsium komersial dalam bentuk garam kalsium anorganik seperti kalsium karbonat dan kalsium sitrat yang berada dalam bentuk ionik bebas, kalsium yang diperoleh dalam penelitian ini berada dalam matriks peptida dengan gugus aktif karboksil dan amino sebagai ligan (An dkk., 2022; Zhang & Liu, 2022). Keberadaan ligan peptida ini berpotensi meningkatkan stabilitas dan bioavailabilitas kalsium dibandingkan sumber kalsium komersial (Walters dkk., 2018). Meskipun kadar kalsium yang diperoleh tidak secara langsung dibandingkan secara kuantitatif dengan produk komersial, bentuk kalsium yang diperoleh memiliki karakteristik berbeda karena berada dalam matriks peptida.

3.2. Kadar Protein Kasar

Hasil analisis pada Tabel 2 menunjukkan bahwa interaksi waktu hidrolisis dan fermentasi menghasilkan perbedaan kadar protein kasar pada peptida kelat kalsium dari tulang ceker ayam. Kadar protein kasar tertinggi diperoleh pada perlakuan hidrolisis 3 jam dan fermentasi 24 jam (H1F2) sebesar 40,06±0,03%, sedangkan kadar protein kasar terendah diperoleh pada perlakuan hidrolisis 9 jam dan fermentasi 18 jam (H3F1) yaitu 23,84±0,02%. Pengukuran kadar protein pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode Kjeldahl yang mengukur total nitrogen kemudian dikonversi menggunakan faktor 6,25. Metode ini tidak membedakan secara spesifik antara protein utuh, peptida, dan asam amino bebas, sehingga nilai yang dilaporkan merupakan kadar protein kasar (*crude protein*). Meskipun demikian, mengingat produk merupakan hasil hidrolisis enzimatik dan fermentasi sehingga nitrogen terlarut yang terukur didominasi oleh fraksi peptida sebagai produk utama dari kedua proses tersebut (Patil dkk., 2022).

Perbedaan kadar protein kasar ini berkaitan dengan proses hidrolisis enzimatik yang memecah protein kompleks menjadi peptida dengan ukuran lebih kecil dan lebih larut (Patil dkk., 2022). Peptida yang terbentuk memiliki gugus fungsi aktif seperti karboksil dan amino yang berperan dalam interaksi dengan ion kalsium, sehingga berkontribusi dalam pembentukan kompleks peptida kelat kalsium (An dkk., 2022; Walters dkk., 2018). Dengan demikian, kadar protein kasar yang terukur tidak hanya mencerminkan jumlah protein terlarut tetapi juga menunjukkan potensi interaksi dengan mineral kalsium.

Waktu hidrolisis relatif singkat diduga menghasilkan peptida dengan ukuran dan struktur yang masih optimal untuk berinteraksi dengan ion kalsium. Sebaliknya, waktu hidrolisis lebih lama dapat menyebabkan degradasi lanjutan menjadi asam amino bebas yang memiliki kemampuan pengikatan kalsium lebih rendah dibandingkan peptida (Cai dkk., 2025). Hal ini menyebabkan penurunan kadar protein kasar terukur sekaligus menurunkan potensi interaksi dengan kalsium pada perlakuan dengan waktu hidrolisis lebih panjang. Proses fermentasi berperan dalam memodifikasi protein melalui aktivitas enzim proteolitik yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Mousavi & Mousavi, 2021). Aktivitas enzim ini dapat melanjutkan proses pemecahan protein menjadi peptida yang lebih sederhana dan lebih larut sehingga meningkatkan fraksi protein terlarut yang berpotensi berinteraksi dengan ion kalsium. Kondisi ini mendukung hasil penelitian yang menunjukkan bahwa perlakuan dengan waktu fermentasi lebih lama cenderung menghasilkan kadar protein kasar lebih tinggi.

Kadar protein kasar tinggi berhubungan dengan peningkatan kadar kalsium karena peptida yang terbentuk menyediakan lebih banyak gugus aktif untuk pengikatan ion Ca^{2+} (Hu dkk., 2022; Wang dkk., 2020). Selain itu, kadar abu (Tabel 2) sebagai indikator mineral juga menunjukkan pola yang sejalan sehingga mengindikasikan keberadaan protein dalam bentuk peptida berperan dalam mempertahankan mineral dalam sistem. Variabel pendukung lainnya seperti kadar lemak yang rendah, kadar air yang rendah, dan karbohidrat sebagai substrat fermentasi turut berkontribusi dalam mendukung pembentukan kompleks peptida–kalsium sebagaimana diuraikan pada subbab berikutnya.

3.3. Kadar Abu

Kadar abu tertinggi diperoleh pada perlakuan hidrolisis 3 jam dan fermentasi 24 jam (H1F2) sebesar 14,36±0,01%, sedangkan kadar abu terendah diperoleh pada perlakuan hidrolisis 3 jam dan fermentasi 18 jam (H1F1) yaitu 12,96±0,02%. Perbedaan kadar abu ini mencerminkan variasi jumlah mineral yang terlarut selama proses hidrolisis dan fermentasi karena kalsium merupakan komponen utama dari mineral tersebut. Proses hidrolisis enzimatik berperan dalam memecah matriks organik tulang sehingga

mempermudah pelepasan mineral ke dalam medium (Pertiwi dkk., 2018). Pelepasan mineral ini menghasilkan peningkatan kadar abu yang terukur dalam hidrolisat.

Proses fermentasi turut meningkatkan pelarutan mineral melalui produksi asam organik (Mousavi & Mousavi, 2021). Ion kalsium yang terlepas tersebut kemudian berinteraksi dengan peptida hasil hidrolisis sehingga berkontribusi pada pembentukan kompleks peptida kelat kalsium (Wang dkk., 2020). Oleh karena itu, peningkatan kadar abu tidak hanya menunjukkan peningkatan mineral total, tetapi juga berkaitan dengan ketersediaan kalsium untuk proses kelasi. Peningkatan kadar abu tersebut sejalan dengan kadar protein kasar yang menunjukkan bahwa peptida terbentuk berperan dalam mempertahankan mineral dalam sistem melalui interaksi dengan ion kalsium. Peptida dengan gugus aktif mampu mengikat ion Ca^{2+} sehingga mencegah terjadinya kehilangan mineral selama proses pengolahan (An dkk., 2022).

3.4. Kadar Air

Hasil kadar air tertinggi diperoleh pada perlakuan H2F1 yaitu 2,03±0,01%, sedangkan kadar air terendah diperoleh pada perlakuan H1F1 sebesar 1,83±0,02%. Perbedaan kadar air ini berkaitan dengan kondisi proses yang memengaruhi stabilitas sistem, termasuk keberadaan kalsium dalam bentuk terikat. Kadar air yang lebih rendah menunjukkan berkurangnya jumlah air bebas dalam sistem sehingga dapat meningkatkan stabilitas kompleks peptida–kalsium yang terbentuk. Dalam kondisi kadar air rendah, interaksi antara peptida dan ion Ca^{2+} cenderung lebih stabil karena minimnya gangguan dari molekul air yang dapat bersaing dalam proses interaksi ionik (Zhang & Liu, 2022).

Sebaliknya, kadar air yang lebih tinggi dapat meningkatkan mobilitas molekul dalam sistem dan berpotensi menyebabkan interaksi antara ion kalsium dan peptida menjadi kurang stabil. Air dalam jumlah tinggi dapat berperan sebagai medium yang memfasilitasi disosiasi sebagian kompleks peptida–kalsium sehingga menurunkan jumlah kalsium yang terikat dalam sistem (An dkk., 2022). Perolehan kadar air juga berkaitan dengan proses pengolahan karena fermentasi dan hidrolisis dapat memengaruhi distribusi air dalam bahan. Perlakuan dengan kadar air yang lebih rendah pada penelitian ini sejalan dengan kadar kalsium yang lebih tinggi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kondisi sistem yang lebih kering cenderung mendukung kestabilan kompleks peptida kelat kalsium yang terbentuk.

3.5. Kadar Lemak

Kandungan lemak tertinggi diperoleh pada perlakuan H2F2 1,15±0,03% dan perlakuan H3F1 dengan kandungan lemak terendah yaitu 0,95±0,02%. Perbedaan kadar lemak ini berkaitan dengan perubahan komponen lipid selama proses hidrolisis dan fermentasi. Hidrolisis dapat menyebabkan pelepasan lemak dari matriks jaringan, sedangkan fermentasi dapat memicu degradasi sebagian komponen lemak melalui aktivitas enzim mikroorganisme (Harahap dkk., 2023).

Jika dikaitkan dengan kadar protein kasar, kandungan lemak yang lebih rendah cenderung mendukung proses hidrolisis protein yang lebih efektif. Keberadaan lemak dalam jumlah tinggi dapat menghambat akses enzim terhadap substrat protein sehingga menurunkan efisiensi pemecahan protein menjadi peptida (Patil dkk., 2022). Oleh karena itu kadar lemak yang rendah pada perlakuan tertentu dapat berkontribusi terhadap peningkatan pembentukan peptida yang berperan dalam pengikatan kalsium.

Kadar lemak juga berpengaruh terhadap interaksi antara peptida dan ion kalsium. Lemak dalam sistem dapat membentuk interaksi nonpolar yang berpotensi mengganggu kontak antara gugus aktif peptida dan ion Ca^{2+} sehingga menghambat pembentukan kompleks peptida kelat kalsium (Walters dkk., 2018). Oleh karena itu kadar lemak yang lebih rendah

cenderung menciptakan kondisi yang ditambahkan mendukung interaksi antara protein (dalam bentuk peptida) dan kalsium.

3.6. Kadar Karbohidrat

Kadar karbohidrat dihitung secara tidak langsung (*by difference*), yaitu berdasarkan selisih antara 100% dengan total komponen lain seperti kadar air, abu, protein, dan lemak (Taufik dkk., 2018). Nilai karbohidrat tertinggi diperoleh pada perlakuan H3F1 sebesar 59,71±0,02% dan nilai terendah pada perlakuan H3F2 sebesar 45,41±0,01%. Tingginya nilai karbohidrat pada produk ini diduga disebabkan terutama oleh kontribusi residu glukosa yang digunakan sebagai substrat fermentasi. Selain memanfaatkan sebagai sumber energi utama, mikroorganisme juga memanfaatkan glukosa dalam menghasilkan enzim proteolitik yang berperan dalam pemecahan protein menjadi peptida (Mousavi & Mousavi, 2021). Namun demikian, tidak seluruh gula dalam substrat habis dikonsumsi selama fermentasi berlangsung, sehingga sebagian residu gula tetap tertinggal dalam produk akhir dan terukur sebagai fraksi karbohidrat pada analisis proksimat (Khairul dkk., 2022).

Hal ini didukung oleh pola data yang konsisten, di mana kadar karbohidrat pada fermentasi 24 jam (F2) secara konsisten lebih rendah dibandingkan fermentasi 18 jam (F1) pada setiap waktu hidrolisis yang sama. Rata-rata karbohidrat pada F1 (18 jam) mencapai 58,997% sedangkan pada F2 (24 jam) sebesar 44,203%. Penurunan ini mencerminkan semakin banyaknya gula yang dikonsumsi oleh mikroorganisme seiring perpanjangan waktu fermentasi. Fenomena ini sejalan dengan pernyataan bahwa efisiensi konsumsi gula oleh mikroorganisme selama fermentasi sangat dipengaruhi oleh durasi inkubasi, di mana waktu fermentasi yang lebih panjang memungkinkan mikroorganisme untuk mengonsumsi lebih banyak substrat gula yang tersedia (Mousavi & Mousavi, 2021). Aktivitas fermentasi memanfaatkan karbohidrat menghasilkan asam organik yang dapat membantu melarutkan kalsium dari matriks bahan menjadi bentuk ionik lebih reaktif. Oleh karena itu ion kalsium yang terlepas dapat berinteraksi dengan peptida hasil hidrolisis untuk membentuk kompleks peptida kelat kalsium.

Selain residu gula, kontribusi glikosaminoglikan (GAG) yang secara alami terdapat dalam jaringan tulang rawan dan ikat ceker ayam juga turut menyumbang nilai karbohidrat pada produk akhir. Penelitian oleh Ata dkk., (2025) pada tulang rawan sternum ayam melaporkan bahwa GAG, khususnya kondroitin sulfat, merupakan konstituen struktural utama matriks ekstraseluler yang dapat terekstraksi selama proses hidrolisis enzimatik. GAG yang terikat pada matriks kolagen akan ikut terlepas dan terekstraksi bersama peptida hasil hidrolisis. Karena metode analisis karbohidrat secara *by difference* tidak membedakan jenis karbohidrat secara spesifik, seluruh fraksi GAG tersebut ikut terhitung sebagai karbohidrat total. Hal ini dibuktikan oleh Widyaningsih dkk., (2017) yang melaporkan bahwa ekstrak tulang rawan ceker ayam mengandung karbohidrat sebesar 24,64% yang sebagian besar berasal dari kontribusi glukosamina (1,26%) dan kondroitin sulfat (0,99%) dalam fraksi GAG. Dengan demikian, tingginya kadar karbohidrat pada produk peptida kelat kalsium dalam penelitian ini merupakan gambaran nyata dari akumulasi dua sumber karbohidrat sekaligus, yaitu residu gula dan fraksi GAG dari tulang ceker ayam.

Hasil analisis ragam (Tabel 1) menunjukkan bahwa interaksi antara waktu hidrolisis dan waktu fermentasi berpengaruh nyata terhadap seluruh variabel yang diamati ($p<0,05$), dengan nilai F interaksi tertinggi pada kadar kalsium ($F=449,423$; $p=0,000$). Hal ini mengindikasikan bahwa pengaruh waktu hidrolisis tidak bersifat independen terhadap waktu fermentasi, melainkan kedua faktor saling memengaruhi dalam menentukan karakteristik produk yang dihasilkan. Nilai $R^2=0,998$ mengindikasikan bahwa model

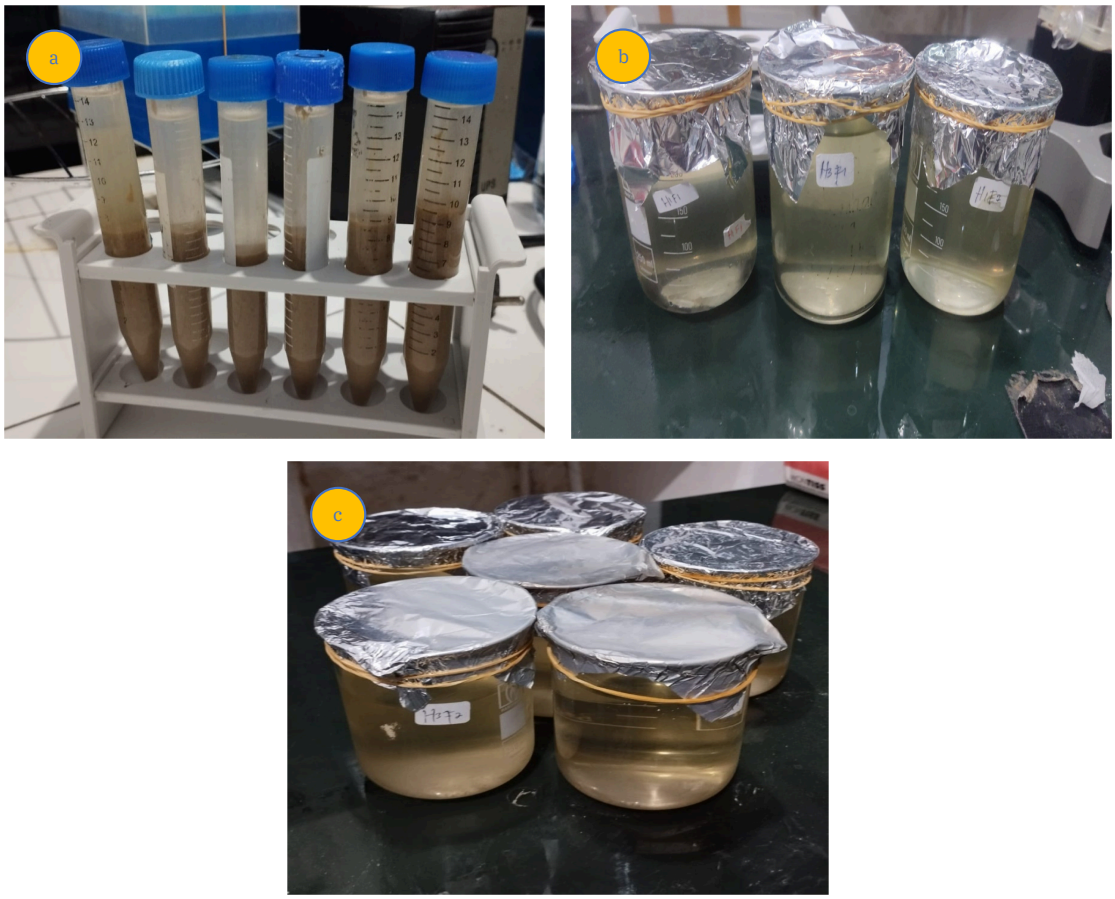
faktorial yang digunakan mampu menjelaskan 99,8% variasi seluruh variabel yang diamati, sehingga model dinilai sangat sesuai dengan data penelitian.

Keterkaitan interaksi kedua faktor terlihat jelas pada pola data Tabel 1 dan Tabel 2. Pada fermentasi 18 jam (F1), penurunan kadar kalsium seiring perpanjangan waktu hidrolisis berlangsung lebih gradual yaitu dari 3,365 turun ke 3,273 mg/100g bk kemudian ke 2,354 mg/100g bk. Fermentasi 24 jam (F2), terjadi penurunan lebih tajam terutama pada perpanjangan hidrolisis dari 3 ke 6 jam yaitu dari 3,847 menurun secara signifikan ke 2,755 mg/100g bk. Pola serupa juga terlihat pada kadar protein kasar, di mana kombinasi hidrolisis singkat dan fermentasi lebih lama (H1F2) secara konsisten menghasilkan nilai tertinggi, sedangkan kombinasi hidrolisis panjang dan fermentasi singkat (H3F1) menghasilkan nilai terendah.

Interaksi antara kedua faktor pada perlakuan H1F2 diduga mencerminkan kondisi positif. Hidrolisis singkat diduga menghasilkan peptida dengan ukuran dan struktur yang masih sesuai untuk berinteraksi dengan ion kalsium, sementara fermentasi 24 jam memberikan waktu yang cukup bagi mikroorganisme untuk menghasilkan asam organik yang melarutkan kalsium dari matriks tulang menjadi bentuk ionik. Kombinasi keduanya diduga menghasilkan kondisi yang lebih optimal bagi pembentukan kompleks peptida kelat kalsium, sebagaimana tercermin dari nilai kadar protein kasar dan kalsium tertinggi yang diperoleh secara bersamaan pada perlakuan yang sama.

Berdasarkan hasil yang telah diuraikan pada masing-masing parameter, dilakukan integrasi pembahasan untuk memahami keterkaitan antarvariabel dalam sistem pembentukan peptida kelat kalsium. Pada Gambar 1, hidrolisat enzim menunjukkan adanya pemecahan matriks protein tulang menjadi fraksi lebih sederhana dengan terbentuknya fase cair dan padatan terdispersi. Proses ini menghasilkan peptida dengan ukuran molekul lebih kecil yang memiliki gugus aktif seperti karboksil dan amino yang berperan dalam pengikatan ion kalsium (An dkk., 2022; Walters dkk., 2018).

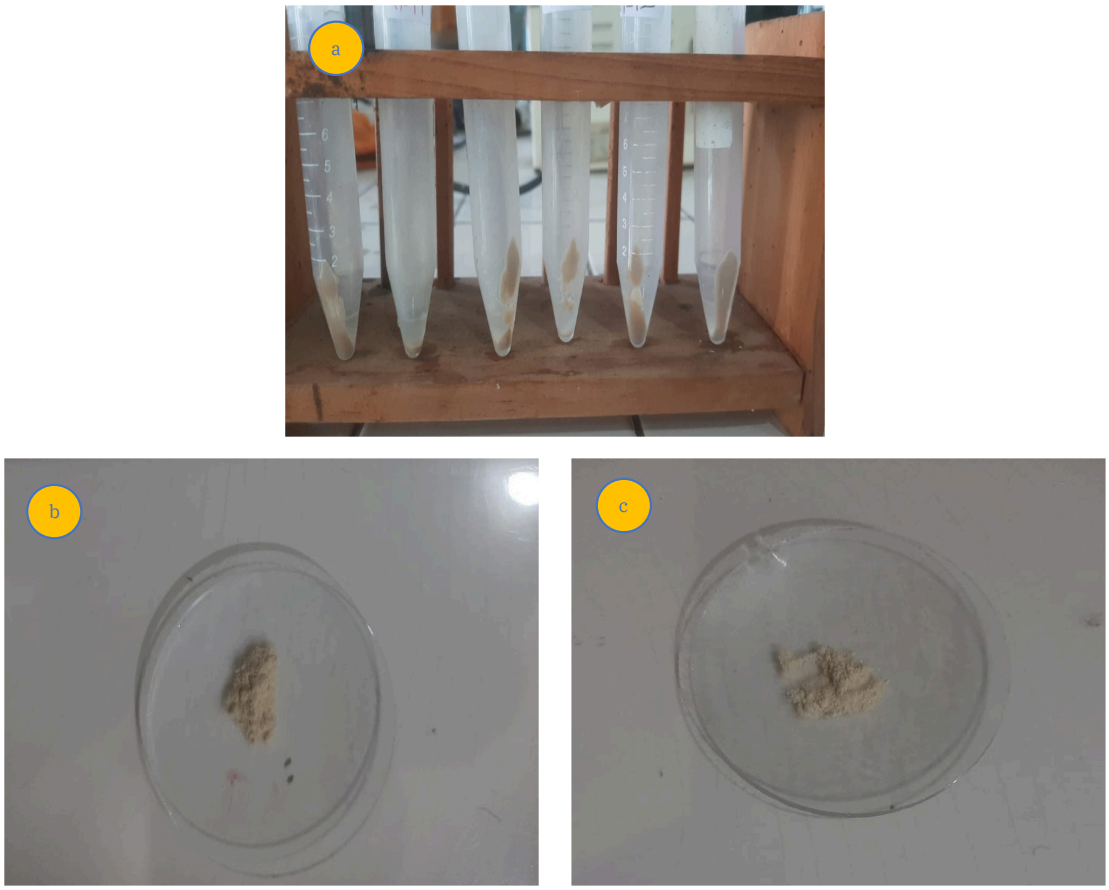
Gambar 1 larutan hasil fermentasi menunjukkan perubahan karakteristik menjadi lebih jernih dengan adanya endapan di bagian bawah. Hal ini mengindikasikan bahwa proses fermentasi berperan dalam melarutkan mineral, terutama kalsium dari matriks tulang melalui produksi asam organik oleh mikroorganisme (Mousavi & Mousavi, 2021). Ion kalsium yang terlepas dalam bentuk Ca^{2+} kemudian berinteraksi dengan peptida hasil hidrolisis untuk membentuk kompleks peptida kelat kalsium (Hu dkk., 2022). Keterkaitan antara kadar protein kasar dan kalsium dalam penelitian ini terlihat dari peran protein yang terhidrolisis menjadi peptida sebagai agen pengikat utama ion kalsium. Perlakuan dengan kadar protein kasar yang lebih tinggi menunjukkan ketersediaan peptida yang lebih besar, sehingga meningkatkan kemungkinan terbentuknya kompleks kelat kalsium. Hal ini sejalan dengan hasil kadar kalsium tertinggi pada perlakuan yang sama, yang menunjukkan bahwa pembentukan peptida berkontribusi langsung terhadap peningkatan kalsium terikat (Cai et al., 2025; Zhang & Liu, 2022). Hal ini sejalan dengan hasil kadar kalsium tertinggi pada perlakuan yang sama, yang menunjukkan bahwa pembentukan peptida berkontribusi langsung terhadap peningkatan kalsium terikat (Cai et al., 2025; Zhang & Liu, 2022).



Gambar 1. a. Hidrolisat enzimatik; b & c. Larutan Fermentasi Hidrolisat Enzimatik

Sumber: Dokumentasi Pribadi. 2026

Variabel lain seperti kadar abu, air, lemak, dan karbohidrat juga berperan dalam mendukung sistem ini. Kadar abu yang tinggi mencerminkan peningkatan kandungan mineral termasuk kalsium. Kadar air yang rendah mendukung stabilitas kompleks peptida kelat kalsium yang terbentuk. Kadar lemak yang rendah memungkinkan interaksi antara peptida dan ion kalsium berlangsung lebih optimal tanpa gangguan dari komponen lipid. Sementara karbohidrat berperan sebagai substrat fermentasi yang mendukung aktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan enzim proteolitik dan asam organik (Mousavi & Mousavi, 2021; Patil dkk., 2022).



Gambar 2. a. Endapan Ion Kalsium; b & c. Bubuk Peptida Kelat Kalsium Tulang Ceker Ayam

Sumber: Dokumentasi Pribadi. 2026

Karakterisasi produk akhir yang ditunjukkan pada Gambar 2 memperlihatkan terbentuknya endapan ion kalsium dan bubuk peptida kelat kalsium. Terbentuknya endapan setelah penambahan etanol anhidrat diduga merupakan hasil pengendapan peptida kelat kalsium dari larutan, di mana etanol berfungsi menurunkan kelarutan kompleks peptida kelat kalsium sehingga terpresipitasi (Wang et al., 2020). Sedangkan bentuk bubuk menunjukkan bahwa produk hasil proses memiliki karakteristik padatan dengan kadar air rendah yang mendukung stabilitas penyimpanan.

Secara visual, warna dan tekstur bubuk yang relatif homogen menunjukkan bahwa proses hidrolisis dan fermentasi menghasilkan produk yang seragam dan mengindikasikan keberhasilan pembentukan kompleks peptida kelat kalsium.

4. Kesimpulan

Variasi waktu hidrolisis dan fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar protein kasar, kalsium, dan karakteristik proksimat peptida kelat kalsium dari tulang ceker ayam. Perlakuan terbaik diperoleh pada kombinasi hidrolisis 3 jam dan fermentasi 24 jam (H1F2) yang menghasilkan kadar protein kasar tertinggi sebesar 40,06±0,03% (bb) dan kadar kalsium tertinggi sebesar 3,847±0,02 mg/100g bk. Semakin panjang waktu hidrolisis menunjukkan kecenderungan penurunan kadar protein kasar dan kalsium, sedangkan fermentasi 24 jam secara konsisten menghasilkan kadar protein kasar lebih tinggi

dibandingkan fermentasi 18 jam pada setiap kombinasi perlakuan. Penelitian lanjutan disarankan untuk mengevaluasi kombinasi waktu hidrolisis dan fermentasi yang lebih beragam, mengonfirmasi struktur peptida kelat kalsium yang terbentuk, serta mengkaji bioavailabilitasnya.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains dan Teknologi (Kemdiktisaintek). Melalui program Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (DPPM) yaitu hibah Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat tahun 2025 telah mendanai penelitian yang dilakukan pada skema Penelitian Dosen Pemula (PDP).

Pernyataan Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa tidak terdapat konflik kepentingan, baik finansial maupun nonfinansial, yang dapat memengaruhi pelaksanaan, analisis, maupun pelaporan hasil penelitian ini.

Penafian

Seluruh isi artikel ini merupakan tanggung jawab penuh penulis dan tidak mencerminkan kebijakan maupun pandangan resmi institusi tempat penulis berafiliasi.

Deklarasi Penggunaan Kecerdasan Buatan (AI)

Penulis menggunakan ChatGPT (OpenAI) untuk membantu penyempurnaan tata bahasa dan gaya penulisan ilmiah, sedangkan Consensus dan Elicit digunakan untuk membantu penelusuran literatur ilmiah yang relevan. Seluruh data penelitian, analisis, interpretasi hasil, pemilihan referensi akhir, serta isi ilmiah artikel merupakan tanggung jawab penuh penulis.

Tentang Penulis

Yusran, dilahirkan di Bone 7 April 1996. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 jurusan Agroindustri di Politeknik Pertanian Negeri Pangkep tahun 2019, S2 jurusan Agroteknologi di Universitas Muslim Indonesia tahun 2022.

Arni AR, dilahirkan di Awotarae 4 Mei 1983. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 jurusan S1 Keperawatan+Ners di Universitas Indonesia Timur tahun 2007/2008, S2 jurusan promosi kesehatan di Universitas Muslim Indonesia tahun 2018.

Darwis, dilahirkan di Wajo 12 Februari 1982 Penulis menyelesaikan pendidikan S1 Jurusan biologi, Fakultas Ilmu Keguruan, Universitas Prima tahun 2008, S2 jurusan Pendidikan Kependudukan dan Lingkungan Hidup Universitas Negeri Makassar tahun 2014 dan S-3 jurusan Pendidikan Kependudukan dan Lingkungan Hidup Universitas Negeri Makassar tahun 2022.

Mirdah Aprilia Amir, dilahirkan di Sengkang, 12 April 1995. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 jurusan Sosial Ekonomi Pertanian, Program Studi Agribisnis, Universitas Hasanuddin tahun 2018,S2 jurusan Magister Manajemen Agribisnis Universitas Gadjah Mada tahun 2022.

Referensi

An, J., Zhang, Y., Ying, Z., Li, H., Liu, W., Wang, J., & Liu, X. (2022). The Formation, Structural Characteristics, Absorption Pathways and Bioavailability of Calcium–Peptide Chelates. *Foods, 11*(18), 2762. https://doi.org/10.3390/FOODS11182762

Ata, O., Bozdogan, N., Mataraci, C. E., Kumcuoglu, S., Kaya Bayram, S., & Tavman, S. (2025). Extraction and Characterization of Valuable Compounds From Chicken Sternal Cartilage: Type II Collagen and Chondroitin Sulfate. *Food Chemistry, 462*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141023

Bardosono, S., Hestiantoro, A., Maruli Tua Lubis, A., Setiati, S., Retno Prijanti, A., Purwantyastuti, A., Sutanto, L., Regina Rachmawati, M., & Tan, S. (2020). Relevance of Calcium and Vitamin D in Supporting Bone Health: An Expert Panel Recommendation in Indonesia. *International Journal of Nutrition and Food Sciences 2020, 9*(2), 54–62. https://doi.org/10.11648/J.IJNFS.20200902.13

Bu, G., Zhao, X., Wang, M., Ti, G., Chen, F., Duan, X., Huang, Y., & Li, P. (2024). Identification of Calcium Chelating Peptides From Peanut Protein Hydrolysate and Absorption Activity of Peptide-Calcium Complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 104*(11), 6676–6686. https://doi.org/10.1002/JSFA.13493

Cai, C., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, J., Wei, B., Xu, C., & Wang, H. (2025). Mineral-Element-Chelating Activity of Food-Derived Peptides: Influencing Factors and Enhancement Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 65*(16), 3241–3255. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2361299

Dai, H., Cao, Y., Fu, Y., Tang, M., Feng, X., Ma, L., & Zhang, Y. (2024). Sustainable and One-Pot Fabrication of Peptide Chelated Calcium From Fish Scale Hydrolysates. *Collagen and Leather, 6*(1), 7-. https://doi.org/10.1186/S42825-024-00150-0

Ding, Q., Sheikh, A. R., Zhu, Y., Zheng, Y., Sun, N., Luo, L., Raynaldo, F. A., Ma, H., & Liu, J. (2025). Preparation and Characterization of Ultrasound-Assisted Novel Peptide–Calcium Chelates from Nannocholoropsis oceanica. *Food and Bioprocess Technology, 18*(3), 2820–2839. https://doi.org/10.1007/S11947-024-03634-3

Fan, C., Liu, Y., Yang, T., Tian, Q., Zhao, X., & Hou, H. (2025). Discovery of Novel Calcium-Chelating Peptides From Antarctic Krill: Structural Elucidation and Dynamic Coordination Mechanisms. *Food chemistry, 493*(Pt 3), 145809. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2025.145809

Han, L., Li, Y., Hu, B., Wang, W., Guo, J., Yang, J., Dong, N., Li, Y., & Li, T. (2024). Enhancement of Calcium Chelating Activity in Peptides from Sea Cucumber Ovum through Phosphorylation Modification. *Foods, 13*(12), 1943. https://doi.org/10.3390/FOODS13121943/S1

Harahap, H., Manurung, R., Iriany, & Yustira, A. (2023). Processing and Utilization of Natural Resources of Gulamah Fish with Boiling and Steaming Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1188*(1), 012025. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1188/1/012025

Horwitz, William. (2006). *Official methods of analysis of AOAC International.* AOAC International.

Hu, G., Li, X., Su, R., Corazzin, M., Dou, L., Sun, L., Hou, P., Su, L., Jin, Y., & Zhao, L. (2024). Effects of Sheep Bone Peptide-Chelated Calcium on Calcium Absorption and Bone Deposition in Rats Fed a Low-Calcium Diet. *Journal of Food Biochemistry, 2024*, 1–14. https://doi.org/10.1155/2024/8434888

Islamy, A., Edhi, S. N., Saraswati, & Nanik, R. (2024). Sirup Glukosa Berbasis Enzim dari Mikroba Lokal sebagai Gula Masa Depan Indonesia: Potensi dan Tantangan. *Pangan, 33*(2), 159–168. https://doi.org/10.33964/JP.V33I2.801

Kekalih, A., Chandra, D. N., Mirtha, L. T., Khouw, I., Wong, G., & Sekartini, R. (2025). Dietary Intakes, Nutritional and Biochemical Status of 6 Months to 12-Year-Old Children Before the COVID-19 Pandemic Era: The South East Asian Nutrition Survey II Indonesia (SEANUTS II) Study in Java and Sumatera Islands, Indonesia. *Public Health Nutrition, 28*(1), e1. https://doi.org/10.1017/S1368980024001654

Khairul, S. A. M., Ainy, M. N., Faridah, A., Jamaludin, N. S., & Ab Rashid, N. K. M. (2022). The Proximate Composition and Metabolite Profiling of Sugarcane (Saccharum officinarum) Molasses. *Malaysian Applied Biology, 51*(2), 63–68. https://doi.org/10.55230/MABJOURNAL.V51I2.2259

Kheeree, N., Kuptawach, K., Puthong, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Boonserm, P., Reamtong, O., Choowongkomon, K., & Karnchanatat, A. (2022). Discovery of Calcium-Binding Peptides Derived From Defatted Lemon Basil Seeds With Enhanced Calcium Uptake in Human Intestinal Epithelial Cells, Caco-2. *Scientific Reports, 12*(1), 4659. https://doi.org/10.1038/S41598-022-08380-0

Liang, R., Jiang, Y., Yokoyama, W., Yang, C., Cao, G., & Zhong, F. (2016). Preparation of Pickering Emulsions With Short, Medium and Long Chain Triacylglycerols Stabilized by Starch Nanocrystals and Their In Vitro Digestion Properties. *RSC Advances, 6*(101), 99496–99508. https://doi.org/10.1039/C6RA18468E

Liao, W., Chen, H., Jin, W., Yang, Z., Cao, Y., & Miao, J. (2020). Three Newly Isolated Calcium-Chelating Peptides from Tilapia Bone Collagen Hydrolysate Enhance Calcium Absorption Activity in Intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68*(7), 2091–2098. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B07602

Mousavi, Z. E., & Mousavi, S. M. A. (2021). Role of Probiotic Bacteria on Bioavailability of Functional Ingredients Under Fermentation Process. Microorganisms for Sustainability, 2, 237–256. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0223-8_10/SAVE-RESEARCH

Muntean, F. L., Olariu, I., Marian, D., Olariu, T., Petrescu, E. L., Olariu, T., & Drăghici, G. A. (2024). Hydroxyapatite from Mollusk Shells: Characteristics, Production, and Potential Applications in Dentistry. *Dentistry Journal, 12*(12), 409. https://doi.org/10.3390/DJ12120409

Muthiah, R. A., Kumalasari, I. D., & Ibdal. (2024). Sifat Fisiko-Kimia, Mikrobiologi dan Organoleptik Roti Tawar Sourdough Tersubstitusi dengan Tepung Umbi Kimpul (*Xanthosoma sagittifolium*). *Pangan, 33*(3), 249–266. https://doi.org/10.33964/JP.V33I3.649

Naghshi, S., Naemi, M., Sadeghi, O., Darooghegi Mofrad, M., Moezrad, M., & Azadbakht, L. (2022). Total, Dietary, and Supplemental Calcium Intake and Risk of All-Cause Cardiovascular, and Cancer Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62*(21), 5733–5743. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1890690

Patil, P. J., Usman, M., Zhang, C., Mehmood, A., Zhou, M., Teng, C., & Li, X. (2022). An Updated Review on Food-Derived Bioactive Peptides: Focus on the Regulatory Requirements, Safety, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 21*(2), 1732–1776. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12911

Pertiwi, M., Atma, Y., Mustopa, A. Z., & Maisarah, R. (2018). Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin dari Tulang Ikan Patin dengan Pre-Treatment Asam Sitrat. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan, 7*(2), 83–91. https://doi.org/10.17728/JATP.2470

Siembab, K., Garbarczyk, W., Napieralska, A., Kapla, A., Černohorská, A., Bednarczyk, D., Białeta, J., Rowińska, K., Jurkiewicz, M., & Pysiewicz, W. (2025). Comparison of Dietary and Supplemental Calcium – A Systematic Review. *Quality in Sport, 38*, 58155. https://doi.org/10.12775/QS.2025.38.58155

Taufik, Moh., Seveline, S., & Saputri, E. R. (2018). Validasi Metode Analisis Kadar Kalsium pada Susu Segar secara Titrasi Kompleksometri. *Agritech, 38*(2), 187–193. https://doi.org/10.22146/AGRITECH.25459

tha, A., Raju, C. V., Lakshmisha, I. P., Kumar, P. A., Sarojini, A., endra, G., & Pal, J. (2019). Nutritional Composition of Fish Bone Powder Extracted from Three different Fish Filleting Waste Boiling with Water and an Alkaline Media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8*(2), 2942–2948. https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2019.802.342

Walters, M. E., Esfandi, R., & Tsopmo, A. (2018). Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods, 7*(10), 172. https://doi.org/10.3390/FOODS7100172

Wang, X., Zhang, Z., Xu, H., Li, X., & Hao, X. (2020). Preparation of Sheep Bone Collagen Peptide–Calcium Chelate Using Enzymolysis-Fermentation Methodology and Its Structural Characterization and Stability Analysis. *RSC Advances, 10*(20), 11624. https://doi.org/10.1039/D0RA00425A

Widyaningsih, T. D., Rukmi, W. D., Sofia, E., Wijayanti, S. D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Rochmawati, N., & Nangin, D. (2017). Extraction of Glycosaminoglycans Containing Glucosamine and Chondroitin Sulfate from Chicken Claw Cartilage. *Research Journal of Life Science, 3*(3), 181–189. https://doi.org/10.21776/UB.RJLS.2016.003.03.7

Yusran. (2024). Studi Kelayakan Usaha Tepung Limbah Ceker Ayam Sebagai Produk Subtitusi Pakan dalam Mendukung Ketahanan Pangan Sektor Peternakan dan Perikanan. *Wanatani, 4*(2), 198–204. https://doi.org/10.51574/JIP.V4I2.324

Zhai, W., Lin, D., Mo, R., Zou, X., Zhang, Y., Zhang, L., & Ge, Y. (2023). Process Optimization, Structural Characterization, and Calcium Release Rate Evaluation of Mung Bean Peptides-Calcium Chelate. *Foods, 12*(5), 1058. https://doi.org/10.3390/FOODS12051058

Zhang, H., Zhao, L., Shen, Q., Qi, L., Jiang, S., Guo, Y., Zhang, C., & Richel, A. (2021). Preparation of Cattle Bone Collagen Peptides-Calcium Chelate and Its Structural Characterization and Stability. *LWT - Food Science and Technology, 144*, 111264. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111264

Zhang, M., & Liu, K. (2022). Calcium Supplements and Structure-Activity Relationship of Peptide-Calcium Chelates: A Review. *Food Science and Biotechnology, 31*(9), 1111–1122. https://doi.org/10.1007/S10068-022-01128-6