

**KARAKTERISASI DAN BIOAVAILABILITAS NANOKALSIUM CANGKANG UDANG
VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*)**

Pipih Suptijah, Agoes M. Jacob, dan Nani Deviyanti
Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor
Email : suptijah@yahoo.com

ABSTRAK

Cangkang udang berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan baku dalam proses pembuatan nanokalsium. Tujuan dari penelitian ini yaitu memanfaatkan cangkang udang vannamei menjadi nanokalsium, menentukan karakteristik nanokalsium secara fisik dan kimia serta mengetahui bioavailabilitas nanokalsium yang dihasilkan. Pembuatan nanokalsium dilakukan dengan metode presipitasi. Nanokalsium memiliki rendemen optimum oleh perendaman cangkang udang selama 48 jam (13,92%). Kadar kalsium optimum dihasilkan oleh perendaman cangkang udang selama 48 jam (85,49%). Hasil analisis AAS menunjukkan nanokalsium masih mengandung komponen mineral lain yaitu magnesium, kalium, natrium, fosfor, besi, seng, dan mangan. Nanokalsium yang dihasilkan memiliki nilai pH sebesar 9,40. Ukuran partikel nanokalsium berkisar antara 37-127 nm. Nanokalsium memiliki nilai derajat putih berkisar 81,73-93,39%, dengan rata-rata 87,56%. Bioavailabilitas nanokalsium cukup tinggi pada menit ke-7 yaitu sebesar 63,3%.

Kata kunci : AAS, bioavailabilitas, cangkang udang Vannamei, nanokalsium, dan SEM

ABSTRACT

Shrimp shells have a potential to be used as raw materials in the manufacturing of nanocalcium. The purpose of this research was utilizing white shrimp shells into nanocalcium, characterized physically and chemically, and determined the bioavailability. Presipitation method was used to produce nanocalcium. Optimum yield of nanocalcium obtained from 48 hours submersion (13,92%). Optimum calcium level was produced by 48 hours submersion, (85.49%). Based on the analysis of AAS, nanocalcium still contained other mineral components example magnesium, potassium, sodium, phosphorus, iron, zinc, and manganese. Nanocalcium had pH value of 9.40. Nanocalcium particle size ranged from 37 nm to 127 nm. Nanocalcium white degree values of Nanocalcium ranged from 81.73 to 93.39%, with an average of 87.56%. Bioavailability of nanocalcium was 63.3% at 7 minutes.

Keyword: AAS, bioavailability, nanocalcium, SEM, and white shrimp shells

I. PENDAHULUAN

Kalsium merupakan salah satu nutrisi esensial yang sangat dibutuhkan untuk berbagai fungsi tubuh (Gobinathan *et al.* 2009). Salah satu fungsi kalsium bagi tubuh adalah sebagai nutrisi untuk tumbuh, menunjang perkembangan fungsi motorik agar lebih optimal dan berkembang dengan baik. Orang dewasa memerlukan kalsium sebanyak 800 mg/hari. Kekurangan kalsium pada masa pertumbuhan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan tulang, osteoporosis, dan osteomalasia (Nieves 2005).

Permasalahan kekurangan kalsium dalam tubuh disebabkan oleh kalsium yang umum ada di masyarakat adalah mikrokalsium, yang ternyata masih belum optimal terserap oleh tubuh, akibatnya dapat menimbulkan defisiensi kalsium yang berdampak pada berbagai keluhan pada tulang, gigi, darah, syaraf, dan metabolisme tubuh (Tongchan *et al.*, 2009). Diperlukan teknologi pengecilan ukuran, berupa teknologi nano. Teknologi nano dapat menciptakan suatu kalsium dengan ukuran yang sangat kecil (10-1000 nm). Nanokalsium dapat langsung terserap oleh tubuh dengan sempurna, hal tersebut lebih efisien dibandingkan dengan kalsium yang biasa dikonsumsi masyarakat, serta sangat bermanfaat dalam pemenuhan kalsium tubuh yang optimal dan dapat dikonsumsi untuk segala usia (Suptijah 2009).

Indonesia memiliki 170 perusahaan pengolahan udang dengan total produksi sekitar 500.000 ton per tahun. Sebanyak 75% dari berat total udang menjadi limbah, yaitu bagian cangkang dan kepala (Kelly *et al.* 2005). Limbah udang tersebut masih belum dimanfaatkan secara optimal. Limbah udang biasanya digunakan untuk pakan ternak yang memiliki nilai ekonomis kecil. Teknologi nanokalsium dapat mengubah limbah udang menjadi nanokalsium yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Penelitian ini bertujuan memanfaatkan cangkang udang *vannamei* menjadi nanokalsium, menentukan karakteristik nanokalsium secara fisik dan kimia serta bioavailabilitas nanokalsium yang dihasilkan.

II. DATA DAN PENDEKATAN

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah cangkang udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) yang didapatkan dari PT Adijaya Guna Satwatama, Cirebon, Jawa Barat.

Alat-alat yang digunakan antara lain *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) merek Perkin Elmer Analyst 100 tipe *flame emission*, spektrofotometer merek LW Scientific tipe UV-200-RS, *Scanning Electron Microscopy* (SEM) merek JSM-35C, *whiteness meter* merek Kett Electric Laboratory tipe C-100.

Komposisi kimia cangkang udang vannamei diketahui dengan analisis proksimat (AOAC 1995). Pembuatan nanokalsium menggunakan metode presipitasi dengan waktu perendaman cangkang udang selama 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam (Suptijah 2009 dengan modifikasi), kemudian rendemen nanokalsium dihitung, dan dilakukan analisis AAS serta spektrofotometer (APHA 2005). Setelah itu nanokalsium dianalisis menggunakan SEM, derajat putih dan derajat keasaman. Nanokalsium diuji bioavailabilitas

pada darah mencit dengan metode *mouse oral* secara *in vivo*.

III. HASIL DAN DISKUSI

3.1. Komposisi Kimia Cangkang Udang Vannamei

Komposisi kimia cangkang udang vannamei meliputi kadar air, abu, lemak, protein, karbohidrat dan abu tak larut asam pada cangkang udang vannamei (Tabel 1). Komposisi kimia cangkang udang vannamei ditentukan dengan analisis proksimat.

Tabel 1 Komposisi Cangkang Udang Vannamei

Parameter	Nilai (%bb)
Kadar air	12,35
Kadar abu	17,13
Kadar protein	47,18
Kadar Lemak	1,25
Kadar Karbohidrat <i>by difference</i>	22,09
Kadar abu TLA	0,44

Kadar air cangkang udang vannamei yang dihasilkan dari penelitian ini tergolong rendah yaitu sebesar 12,35%, karena udang vannamei yang diukur kadar airnya yaitu cangkang udang kering sudah mengalami proses penjemuran oleh sinar matahari. Kadar air cangkang udang *Penaeus notabilis* berdasarkan penelitian Emmanuel *et al.* (2008) adalah sebesar 13,3%. Cangkang udang dari spesies yang berbeda memiliki kadar air yang relatif sama.

Analisis kadar abu pada cangkang udang vannamei hasil penelitian ini sebesar 17,13% (bb) atau 19,54% (bk). Nilai kadar abu ini lebih rendah dibandingkan kadar abu yang diteliti oleh Ravichandran *et al.* (2009) sebesar 21,5% (bk). Perbedaan nilai kadar abu diduga dapat disebabkan oleh perbedaan hábitat dan lingkungan hidup.

Cangkang udang vannamei memiliki kadar protein sebesar 47,18% (bb). Menurut penelitain yang dilakukan oleh Kim *et al.* (2011) kadar protein cangkang udang

Litopenaeus vannamei sebesar 40,35% (bb). Tingginya kadar protein diduga disebabkan oleh pakan yang diberikan pada udang vannamei. Udang vannamei merupakan udang tambak, dan pakan yang diberikan biasanya mengandung jumlah protein yang lebih banyak dari pada pakan alami.

Cangkang udang vannamei memiliki kadar lemak sebesar 1,43% (bk), hal ini menunjukkan bahwa kadar lemak pada cangkang udang vannamei tergolong rendah. Nilai ini berbeda dengan hasil pengujian yang dilakukan oleh Ravinchandran *et al.* (2009), yaitu 9,8% (bk). Perbedaan kadar lemak dipengaruhi oleh jenis udang dan fase hidup udang saat dipanen.

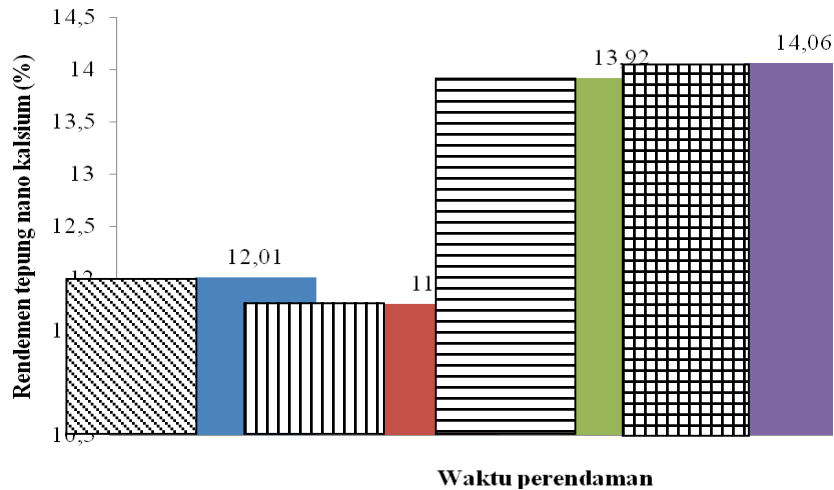
Hasil perhitungan kadar karbohidrat dengan metode *by difference* menunjukkan bahwa cangkang udang vannamei mengandung karbohidrat sebesar 21,5%. Hasil perhitungan karbohidrat dengan metode *by difference* ini merupakan metode penentuan kadar karbohidrat dalam bahan pangan secara kasar, serat kasar juga terhitung sebagai karbohidrat (Winarno 2008).

Hasil pengujian kadar abu tidak larut asam menunjukkan bahwa cangkang udang

mengandung residu sebesar 0,44%. Kadar abu pada penelitian ini masih di bawah 1%, seperti yang disyaratkan oleh Basmal *et al.* (2003). Kadar abu tak larut asam diduga berasal dari material-material yang terdapat di perairan tempat udang vannamei hidup, seperti pasir, lumpur, silika dan batu yang masih menempel pada sampel saat penjemuran.

3.2. Rendemen Nanokalsium

Rendemen nanokalsium dengan perendaman cangkang udang dengan HCl selama 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam memiliki nilai berturut-turut sebagai berikut 12,01%, 11,76%, 13,92% dan 14,06% (Gambar 1). Waktu perendaman 48 jam menghasilkan rendemen optimum, yaitu 13,92%. Perendaman 48 jam kemudian digunakan untuk penelitian utama yaitu diukur kadar mineral dengan AAS dan spektrofotometer, diukur ukurannya dengan SEM, derajat putihnya, nilai pH, dan bioavailabilitas nanokalsium dalam tubuh tikus putih secara *in vivo*.



Gambar 1 Rendemen Nanokalsium (perendaman 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam)

Perendaman cangkang udang dengan HCl 1 N menyebabkan mengembangnya matrik cangkang udang sehingga memudahkan pelarut masuk ke dalam matrik, hal ini juga menyebabkan pelepasan kalsium yang lebih mudah dari cangkang udang. Waktu perendaman (*retention time*) cangkang udang di dalam larutan HCl 1 N mempengaruhi penurunan kadar mineral pada proses pembuatan kitin (Mahmoud *et al.* 2005).

3.3. Komposisi Mineral Nanokalsium

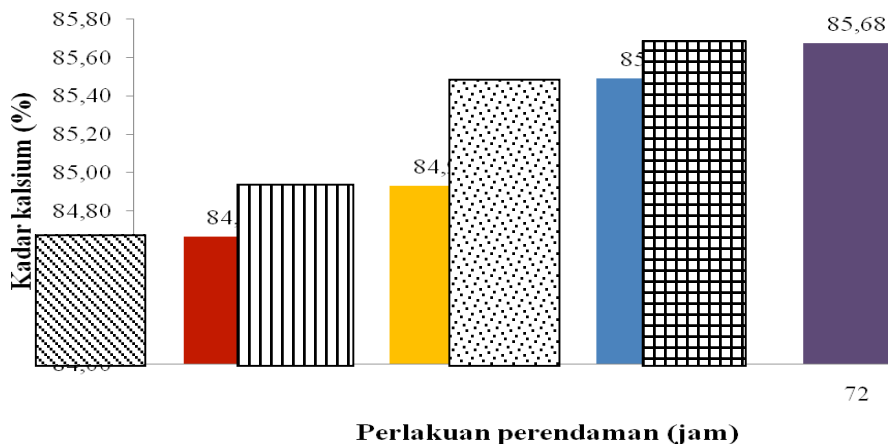
Berdasarkan analisis AAS dan spektrofotometer diketahui bahwa nanokalsium mengandung komposisi makromineral seperti Ca, Mg, P, K, dan Na serta mikromineral seperti Mn, Fe, dan Zn (Tabel 2). Komponen utama penyusun nanokalsium cangkang udang vannamei adalah kalsium. Kalsium merupakan penyusun utama cangkang udang (Kelly *at al.* 2005).




Tabel 2 Kandungan Mineral dari Nanokalsium Sesuai Waktu Perendaman

Mineral	Kadar mineral \pm stdev (%)			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
Ca	84,67 \pm 0,01	84,93 \pm 0,17	85,49 \pm 0,23	85,68 \pm 0,20
Mg	2,60 \pm 0,00	2,86 \pm 0,00	1,79 \pm 0,00	1,86 \pm 0,01
K	0,00 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
Fe	0,48 \pm 0,00	0,61 \pm 0,02	0,71 \pm 0,00	0,55 \pm 0,01
Mn	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
Zn	1,40 \pm 0,00	1,55 \pm 0,00	1,74 \pm 0,00	1,82 \pm 0,01
Na	0,19 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00	0,33 \pm 0,00	0,50 \pm 0,00
P	10,61 \pm 0,03	9,77 \pm 0,04	9,84 \pm 0,09	9,50 \pm 0,04

Proses perendaman cangkang udang dengan menggunakan HCl meningkatkan kadar kalsium (Gambar 2). Proses perendaman menyebabkan terbukanya pori-pori cangkang udang secara maksimal, sehingga ruang-ruang yang terbentuk memudahkan dicapai oleh pengestrak (HCl), dengan demikian mineral mudah terlepas atau terekstrak dengan optimum (Suptijah 2009). Perendaman

berpengaruh terhadap kadar kalsium (Ebuehi *et al.*, 2007). Perendaman yang diikuti pemanasan dapat menurunkan kandungan serat sehingga meningkatkan kandungan kalsium (Udensi *et al.* 2009). Perendaman dalam asam juga dapat menurunkan kandungan fitat, kandungan ini telah dikenal sebagai pengkelat kalsium (Yagoub *et al.* 2008).



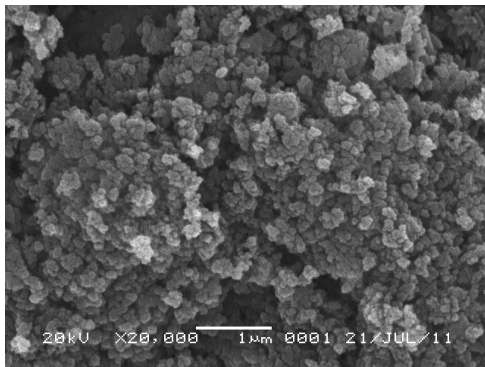
Gambar 2 Kadar kalsium (perendama 0 jam , 24 jam , 48 jam  dan  72 jam)

3.4. Analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

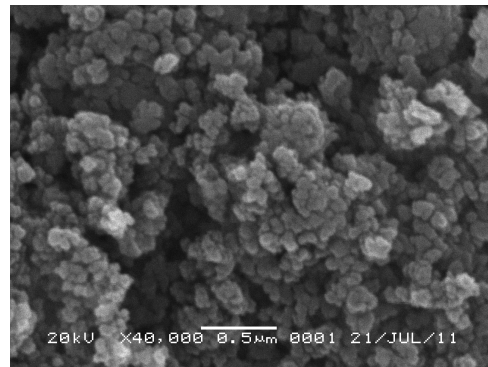
Hasil analisis SEM dengan perbesaran 80.000x menunjukkan bahwa nanokalsium memiliki nilai 37-127 nm (Gambar 3), dan digolongkan ke dalam nanopartikel karena sesuai dengan pengertian nanopartikel yang dijelaskan oleh Mohanraj dan Chen (2006), yaitu nanopartikel adalah partikel yang berukuran 10-1000 nm. Nanopartikel dengan ukuran yang sangat kecil, memiliki kelarutan

yang lebih baik dibandingkan obat biasa di dalam tubuh (Min *et al.*, 2008).

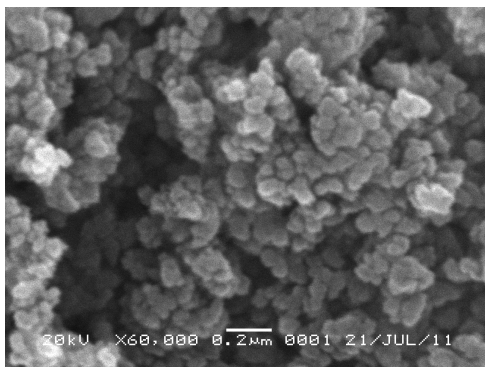
Nanokalsium dibuat dengan metode presipitasi. Proses presipitasi dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan di dalam larutan melalui perubahan pH. Nanokalsium yang dihasilkan pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan nanopartikel yang dihasilkan oleh Wu *et al.* (2008) yaitu berkisar 20-200 nm.



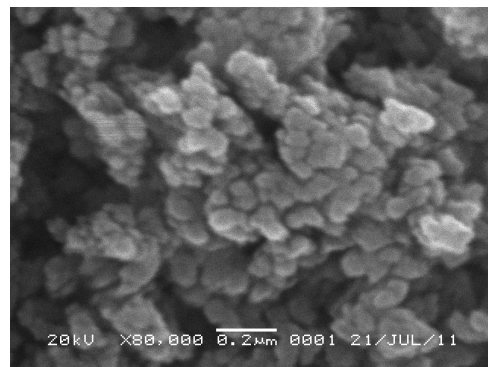
(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 3 Hasil SEM perbesaran 20.000x (a) dan perbesaran 40.000x (b) perbesaran 60.000x (c) dan perbesaran 80.000x (d)

3.5. Analisis Derajat Keasaman (pH)

Analisis pH menunjukkan bahwa nanokalsium memiliki nilai pH 9,40. Bahan penyusun nanokalsium adalah kalsium oksida (CaO). Kalsium oksida merupakan bubuk putih dengan pH tinggi yaitu 12,6 (Estrela dan Holland 2003). Lebih rendahnya nilai nanokalsium karena terdapatnya proses netralisasi dengan akuades. Nilai pH yang tinggi bisa dijadikan sebagai alternatif antimikroba (Cavalcante *et al.*, 2010).

Nilai pH berkaitan dengan nanokalsium sebagai bahan tambahan pangan.

Nilai pH yang basa tidak berbahaya bagi tubuh karena umumnya nanokalsium difortifikasi ke dalam susu instan yang mengandung protein kasein. Protein kasein bersifat asam sehingga mampu membantu ikatan antara kasein dengan nanokalsium (Anggraeni *et al.* 2009).

3.6. Analisis Derajat Putih

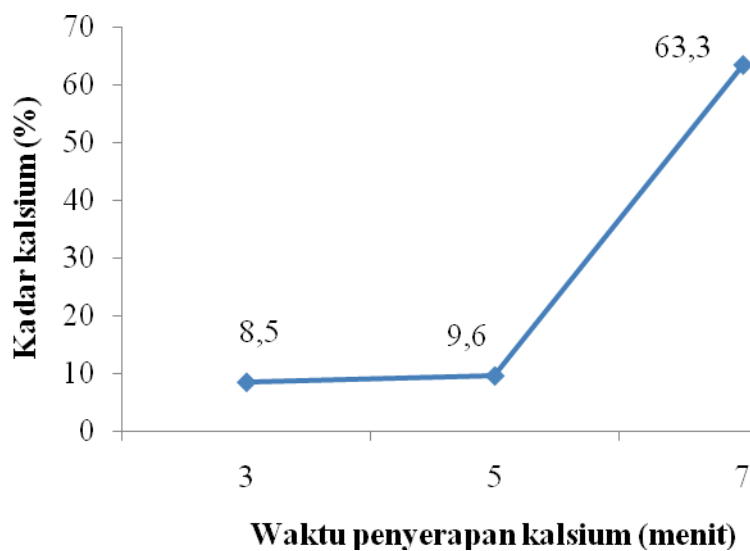
Nilai derajat putih nanokalsium yang dihasilkan 81,73%-93,39% dengan rata-rata 87,56%. Derajat putih nanokalsium dipengaruhi komponen mineral penyusunnya. Komponen utama penyusun nanokalsium ini

adalah kalsium. Kalsium memiliki warna putih, oleh sebab itu nilai derajat putih dari nanokalsium juga tinggi (Estrela dan Holland 2003).

Mineral secara alami memiliki warna yang berbeda, Na dan K yang termasuk unsur-unsur golongan IA memiliki warna keperakan, Mg memiliki warna putih keabu-abuan, mangan berwarna merah jambu, P berwarna hitam dan merah, dan Fe berwarna hijau pucat (Cotton dan Wilkinson 2007). Kandungan P dan Mg yang lebih mendominasi dari nanokalsium setelah kalsium. P memiliki nilai 9,50%-10,61% dan Mg memiliki nilai 1,79%-2,60%. P dan Mg yang diduga penyebab penurunan nilai derajat putih nanokalsium.

3.7. Bioavailabilitas Nanokalsium

Hasil analisis bioavailabilitas menunjukkan bahwa pada menit ke-3, ke-5, dan ke-7 nanokalsium yang terserap tubuh sebesar 8,5%, 9,6%, dan 63,3% (Gambar 4). Bioavailabilitas nanokalsium lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Trilaksani *et al.* (2006) pada tepung tulang ikan tuna, yaitu 0,86%. Tingginya bioavailabilitas nanokalsium memberikan banyak keuntungan bagi manusia. Nanokalsium dapat difortifikasi pada bahan pangan sehingga dapat memenuhi kebutuhan kalsium harian orang dewasa sekitar 800 mg/hari.



Gambar 4. Bioavailabilitas nanokalsium pada darah tikus putih

Partikel nanokalsium berukuran sangat kecil yaitu 37-127 nm. Nanokalsium memiliki bioavailabilitas yang lebih tinggi

dibandingkan dengan kalsium yang berukuran makro, sehingga cepat memasuki reseptor dan terabsorpsi dengan sempurna (Suptijah 2009).

Gao *et al.* (2007) menambahkan, tikus yang diberi nanokalsium memiliki buangan kalsium yang rendah pada feses dan urin dibandingkan tikus yang diberi pakan mikrokalsium. Semakin kecil ukuran partikel, maka tingkat penyerapan kalsium dalam tubuh akan semakin meningkat.

Pengukuran bioavailabilitas kalsium digunakan untuk menjelaskan proses fisikokimia dan fisiologis yang mempengaruhi penyerapan fraksional kalsium dalam tubuh sehingga mineral tersebut dapat digunakan oleh tubuh untuk menjalankan fungsi metabolisme (Trilaksani *et al.* 2006).

IV. KESIMPULAN

Nanokalsium memiliki rendemen yang optimal diperoleh dari perendaman cangkang udang selama 48 jam, yaitu 13,92%. Kadar kalsium optimal dihasilkan oleh perendaman cangkang udang selama 48 jam, yaitu 85,49%. Mineral penyusun utama nanokalsium adalah kalsium, tetapi nanokalsium juga mengandung komponen mineral yang lainnya yaitu magnesium, kalium, natrium, fosfor, besi, seng, dan mangan. Nanokalsium yang dihasilkan memiliki nilai pH sebesar 9,40. Nanokalsium yang diperoleh termasuk dalam nanopartikel. Nanokalsium memiliki nilai derajat putih sebesar 87,56%. Bioavailabilitas nanokalsium cukup tinggi pada menit ke-7 yaitu 63,3%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni A, Sumantri C, Farajallah A, Andreas E. 2009. *Verifikasi Kontrol Gen Kappa Kasein pada Protein Susu Sapi Friesian-Holstein di Daerah Sentra Produksi Susu Jawa Barat*. *JITV* 14(2): 131-141.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1995. *Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*. Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemist, Inc.
- [APHA] American Public Health Association. 2005. *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater 21st ed.* New York: American Public Health Association, Inc.
- Basmal J, Syarifudin, Ma'ruf WF. 2003. *Pengaruh konsentrasi larutan potassium hidroksida terhadap mutu kappa-karaginan yang diekstraksi dari Euchema cottonii*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 9(5):95-103.
- Cavalcantea AM, Limab JCS, Santosc LM, Oliveirab PCC, Júniora KALR, Sant'anaa AEG. 2010. *Comparative evaluation of the pH of calcium hydroxide powderin contact with carbon dioxide (CO₂)*. *Materials Research* 13(1):1-4.
- Cotton FA, Wilkinson G. 2007. *Kimia Anorganik Dasar*. Suharto S, Penerjemah, Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia – Jhon Willey and Son Inc. Terjemahan dari: *Basic Inorganic Chemistry*.
- Ebuehi OAT, Oyewole AC. 2007. Effect of cooking and soaking on physical characteristics, nutrient composition and sensory evaluation of indigenous

- and foreign rice varieties in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6(8):1016-1020.
- Emmanuel, Adeyeye I, Adubiaro HO, Awodola OJ. 2008. *Comparability of Chemical Composition and Functional Properties of Shell and Flesh of Penaeus notabili*. *Journal of Nutrition* 7(6):741-747.
- Estrela C, Holland R. 2003. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *Journal Appl Oral Sci*; 11(4): 269-82.
- Gao H, chen H, Chen W, Tao F, Zheng Y, Jiang Y, Ruan H. 2007. Effect of nanometer pearl power on calcium absorption and utilization in rats. *Journal of Food Chemistry* 109: 493-498.
- Gobinathan P, Murali PV, Panneerselvam R. 2009. Interactive Effects of Calcium Chloride on Salinity-Induced Proline Metabolism in *Pennisetum typhoides*. *Advances in Biological Research* 3(5-6):168-173.
- Kelly CG, Agbagbo FK, Holtzaple MT. 2005. *Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed*. *J of Bioresource Technology* 97:1515-1320
- Kim JD, Nhut TM, Hai TN, Ra CS. 2011. *Effect of Dietary Essential Oils on Growth, Feed Utilization and Meat Yields of White Leg Shrimp L. Vannamee*. *Journal Anim. Sci* 24(8):1136-1141.
- Mahmoud MS, Ghaly AE, Arab F. 2005. *Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production*. *Journal of Biotechnology* 3(1):1-9.
- Min SKMN, Shun JJ, Jeong SK, Hee JP, Ha SS, Reinhard HHN, Sung JH. 2008. Preparation, Characterization and *In Vivo* Evaluation of Amorphous Atorvastatin Calcium Nanoparticles Using Supercritical Antisolvent (SAS) Process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69:454-465.
- Mohanraj VJ, Chen Y. 2006. Nanoparticels – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1):561-573.
- Nieves JW. 2005. Osteoporosis: the role of micronutrient. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:1232-1239.
- Ravichandran S, Rameshkumar G, Prince AR. 2009. Biochemical composition of shell and flesh of the indian white shrimp *Penaeus indicus* (H.milne Edwards 1837). *Journal of Scientific Research* 4(3):191-194.
- Suptijah P. 2009. *Nanokalsium Hewani dari Perairan*. Di dalam: Buklet 101 Inovation. Penerbit: BIC Kementrian Ristek.
- Tongchan P, Prutipanlai S2, Niyomwas S, Thongraung S. 2009. Effect of calcium compound obtained from fish by-product on calcium metabolism in rats. *J. Food Ag-Ind.* 2(04),669-676.
- Trilaksani W, Salamah E, Nabil M. 2006. Pemanfaatan limbah tulang ikan tuna (*Thunnus* sp.) sebagai sumber kalsium dengan metode hidrolisis protein. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 9(2):34-45.

Udensi EA, Arisa NU, Ikpa E. 2009. *Effects of soaking and boiling and autoclaving on the nutritional quality of Mucuna flagellipes ("ukpo")*. *African Journal of Biochemistry Research* 4(2):47-50.

Winarno FG. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Edisi Revisi. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

Wu TH, Yen FL, Lin TL, Tsai TR, Lin CC, Cham TM. 2008. *Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effect of quercetin nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics* 346:160-168.

Yagoub AEGA, Mohhamed MA, Baker AAA. 2008. *Effect of soaking, sprouting and cooking on chemical composition, bioavailability of minerals and in vitro protein digestibility of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) seed*. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(1):50-56.