

Dr. Rahim Husain, S.Pi., M.Si.

KINETIKA OKSIDASI PROTEIN IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp*)



**KINETIKA OKSIDASI PROTEIN
IKAN KAKAP MERAH
(*Lutjanus sp*)**

Dr. Rahim Husain, S.Pi., M.Si.



**KINETIKA OKSIDASI PROTEIN IKAN KAKAP MERAH
(*Lutjanus sp*)**

Penulis

Dr. Rahim Husain, S.Pi., M.Si.

Tata Letak

Ulfa

Desain Sampul

Faizin

15.5 x 23 cm, vi + 60 hlm.

Cetakan pertama, Desember 2022

ISBN: 978-623-466-179-8

Diterbitkan oleh:

ZAHIR PUBLISHING

Kadisoka RT. 05 RW. 02, Purwomartani,

Kalasan, Sleman, Yogyakarta 55571

e-mail : zahirpublishing@gmail.com

Anggota IKAPI D.I. Yogyakarta

No. 132/DIY/2020

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak
sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena dengan rahmat-Nya, buku yang berjudul ***Kinetika Oksidasi Protein Ikan Kakap Merah (Lutjanus sp)*** dapat penulis selesaikan. Oksidasi protein adalah terjadinya modifikasi ikatan kovalen pada protein yang diinduksi baik secara langsung oleh senyawa-senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) maupun secara tidak langsung oleh produk-produk sekunder dari keadaan stress oksidatif.

Protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi (antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksil, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya), molekul-molekul pengoksidasi non radikal (oksigen singlet, HOCl, HOBr, peroksinitrit, O₃ dan sinar ultra violet), dan oleh reaksi-reaksi sekunder dari produk-produk intermediate oksidasi protein yang reaktif serta oleh produk oksidasi protein itu sendiri.

Selain oleh senyawa oksigen reaktif, kerusakan oksidatif protein dapat juga disebabkan oleh interaksi dengan produk-produk hasil oksidasi lipid seperti 4-hidroksinonenal dan malonaldehid.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada pihak yang tangan dan memberi bantuan penyusunan dan penerbitan buku ini. Akhirnya dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan semoga buku ini bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Gorontalo, Juli 2022

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----|
| KATA PENGANTAR | iii |
| DAFTAR ISI | v |
| BAB I | |
| PENDAHULUAN | 1 |
| BAB II | |
| OKSIDASI PROTEIN PADA IKAN KAKAP MERAH (<i>Lutjanus sp</i>) .. | 5 |
| A. Karakteristik Ikan Kakap | 5 |
| B. Mekanisme Oksidasi Protein | 6 |
| C. Rantai Samping Alifatik | 13 |
| D. Rantai Samping Aromatik..... | 15 |
| BAB III | |
| FAKTOR-FAKTOR PENYEBAB OKSIDASI PROTEIN..... | 19 |
| A. Oksigen triplet | 19 |
| B. Oksigen Singlet | 21 |
| C. Peroksinitrit | 23 |
| BAB IV | |
| PROSES VALIDASI MODEL KINETIKA OKSIDASI..... | 25 |
| BAB V | |
| KINETIKA OKSIDASI PROTEIN DAN EVALUASI SENSORIS FILLET IKAN | 31 |
| A. Kinetika Oksidasi Protein Ikan | 31 |
| B. Evaluasi Sensoris <i>Fillet</i> Ikan Kakap (<i>Lutjanus sp</i>) dan Minyak Ikan Tuna (<i>Thunnus sp</i>) pada Suhu 40°C..... | 36 |
| BAB VI | |
| PENUTUP | 41 |
| DAFTAR PUSTAKA | 43 |
| TENTANG PENULIS | 60 |

BAB I

PENDAHULUAN

Daging ikan merupakan sumber protein hewani yang penting dan memiliki nilai biologis lebih tinggi dibanding dengan protein daging lain. Daging ikan juga kaya akan asam lemak esensial (*Poly Unsaturated Fatty Acid*, PUFA) dan karenanya sangat rentan terhadap oksidasi lipid yang menyebabkan perubahan tidak diinginkan dalam rasa, tekstur, nilai gizi dan banyak konsekuensi patologis (Jenadkk.,2008).

Telah diketahui bahwa oksidasi lipid merupakan masalah besar selama penyimpanan dan pengolahan, terutama pada spesies otot gelap daging ikan pelagis. Alasan yang mungkin di balik kerentanan ini adalah jumlah pro-oksidan, seperti protein heme (Hb), mioglobin, berat molekul rendah, kompleks logam transisi, dan lipoxigenases pada otot daging ikan (Richards *dkk.*, 2002; Undeland *dkk.*, 2004; Pazos *dkk.*, 2005).

Selain oksidasi lipid, oksidasi protein dan kerusakan pada sistem biologis juga telah dipelajari selama dua dekade terakhir. Hasil dari studi ini menunjukkan bahwa spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) akan menyebabkan oksidasi rantai samping asam amino, pembentukan ikatan silang antar protein-protein, dan oksidasi rantai utama protein, yang mengakibatkan fragmentasi protein. Selain itu, akan terjadi pula mediasi radikal bebas dari oksidasi protein dan lipid yang tidak dapat dihindari pada fase berair yang banyak memproduksi radikal bebas dalam daging ikan (Tokur dan Korkmaz, 2007). Protein mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksida antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksil, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya. Selain senyawa oksigen reaktif, kerusakan protein dapat juga disebabkan oleh produk-produk hasil oksidasi lipid seperti 4-hidroksinonenal

dan malonaldehid serta beberapa aldehid maupun keton reaktif lainnya (Berlett dan Stadman, 1997).

Spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) seperti superoksida (O_2^-), hidroksil (OH^*), peroxy (RO_2^*), alkoxyl (RO^*) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) dalam sistem makanan dan biologis, terjadi secara alami dan dapat bereaksi dengan molekul biologis. Namun, produksi spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) berlebihan dapat merusak kompleks molekul seluler, seperti lemak, protein, atau DNA. Dalam ikan hidup, terdapat mekanisme pertahanan anti- oksidatif yang menetralkan produksi dan efek samping spesies oksigen reaktif, tapi mekanisme ini tidak bekerja setelah kematian sehingga, menyebabkan akumulasi spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) pada daging ikan, yang bisa menyebabkan modifikasi lipid dan protein.

Pada kondisi beku, senyawa oksidasi lipid yang diproduksi berinteraksi dengan protein, menyebabkan oksidasi protein, kehilangan nutrisi dan modifikasi atau perubahan elektroforesis profil protein, sedangkan sistem antioksidan endogen menunjukkan bagian yang hilang (Aubourg dkk., 2004). Oksidasi asam lemak tak jenuh ganda (*Poly Unsaturated Fatty Acid*, PUFA) dimulai dengan produksi hidrogen-peroksida dengan tiga cara yang berbeda: (1) autooksidasi, (2) oksidasi enzimatis, dan (3) fotooksidasi, yang juga bisa terjadi secara bersamaan. Produk peroksida terurai dengan mekanisme yang berbeda, membentuk produk oksidasi sekunder; kedua produk oksidasi sekunder dan primer dapat bereaksi dengan gugus amino protein, menghasilkan senyawa interaksi yang memodifikasi rasa, bau dan sifat fungsional dari protein. Selanjutnya, fraksi volatil senyawa ini diindikasikan sebagai penyebab ketengikan dalam ikan berlemak (Aranda dkk., 2005).

Pemodelan produk makanan adalah tugas rumit karena kurangnya pengetahuan mengenai mekanisme, kesulitan untuk melakukan eksperimen dan mendapatkan banyak data yang dapat dipercaya dan ketidakpastian mengenai sifat makanan. Se jauh ini, pengolahan makanan sebagian besar didedikasikan pada keamanan

produk, stabilisasi dan meningkatkan operasi industri (Sablan dkk., 2007).

Meskipun jumlah yang sangat besar publikasi ilmiahnya (Bimbenet dkk., 2007), perluasan pendekatan untuk pemodelan makanan dan desain dibatasi sebagai berikut: (1) banyak model satuan operasi dikembangkan tetapi penerapannya tidak langsung; (2) banyak ketidakpastian secara luas yang keduanya tersedia untuk sifat bahan baku, parameter desain dan keandalan kondisi operasi (tanpa kontrol khusus diimplementasikan); (3) saat ini, pengetahuan yang akurat dari para ilmuwan makanan telah menyebabkan model spesifikasi, yang berharga dalam domain kecil, yang merupakan salah satu dari komposisi atau lingkungan fisik dan kimia.

Proses rekayasa makanan memiliki tiga tujuan: (1) untuk memahami fenomena pada pengolahan yang dilakukan, (2) untuk merancang unit operasi atau proses dan (3) untuk mengendalikannya. Mengingat pengembangan alat yang tersedia untuk industri kimia dalam tujuan untuk industri makanan dan perbedaan besar muncul. Meskipun banyak model usulan sepanjang waktu untuk makanan, aplikasi alat simulasi untuk situasi kenyataannya masih rendah. Kurangnya pengetahuan, kurangnya parameter ditentukan untuk model yang sering dibahas sebagai tanggung jawab situasi. Dalam kasus proses makanan, umumnya tujuannya sangat kompleks dan banyak.

Sejauh ini informasi dan penelitian mengenai model oksidasi protein dan lemak ikan kakap (ikan-ikan demersal), masih sangat jarang dilakukan dan belum banyak dipelajari secara detail. Ini disebabkan penelitian-penelitian tentang model oksidasi protein dan lemak pada *fillet* ikan belum menjadi perhatian utama dalam bidang pemodelan oksidasi. Adanya informasi yang memadai dari data protein dan lemak secara umum dapat dihasilkan dari ekstrak *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) dan minyak ikan tuna (*Thunnus sp*), diharapkan dapat digunakan untuk membuktikan secara ilmiah bahwa model oksidasi protein dan model oksidasi minyak ikan tuna

(*Thunnus sp*) dapatdi jadikan model dalam proses oksidasi protein dan lemak selama *display* sebagai akibat dari proses otooksidasi.

Kombinasi model oksidasi protein dan model oksidasi lemak masih jarang dilakukan karena mekanisme terjadinya oksidasi protein dan lemak masih diliputi oleh mekanisme yang berbedasehingga, menimbulkan interpretasi mekanisme model oksidasi yang berbeda pula. Model oksidasi ini dapat dilakukan dengan melihat persamaan reaksi yang timbul akibat oksidasi tersebut, termasuk didalamnya adalah oksidasi daging secara keseluruhan.

Model oksidasi lemak dan protein secara terpisah bisa dikerjakan secara sederhana. Kombinasi kedua model diharapkan merupakan interaksi kedua model dan mewakili oksidasi daging ikan mengingat, kedua komponen merupakan penyusun utama daging. Adapun laju oksidasi pada lemak dan protein yang dipengaruhi oleh suhu dan lama waktu penyimpanan menyebabkan kerusakan asam-asam amino penyusun protein serta asam-asam lemak esensial (*Poly Unsaturated Fatty Acid*, PUFA) penyusun lemak.

BAB II

OKSIDASI PROTEIN PADA IKAN KAKAP MERAH (*Lutjanus sp*)

A. Karakteristik Ikan Kakap

Ikan kakap (*Lutjanus sp*) tergolong ikan demersal, selalu berkelompok dan bersembunyi di karang-karang. Panangkaptannya dilakukan dengan pancing kakap, *encircling net* dengan rumpon, jaring insang dan trawl (Nurnadia *dkk*, 2011). Ikan kakap merah mengandung protein tinggi yaitu sebesar 20,45%. Komposisi kimia ikan kakap (*Lutjanus sp*) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi kimia daging ikan kakap (*Lutjanus sp*)

| Senyawa Kimia | Jumlah (%) |
|----------------------|-------------------|
| Air | 78,00 |
| Protein | 20,45 |
| Karbohidrat | 0 |
| Lemak | 1,37 |
| Abu | 1,46 |

Sumber: Nurnadia *dkk.*, 2011

Berdasarkan Tabel 2. terlihat pula bahwa protein merupakan komponen yang dominan dalam daging ikan kakap (*Lutjanus sp*), sedangkan lemak merupakan komponen yang sudah dilaporkan rentan terhadap oksidasi. Peningkatan protein karbonil disebabkan pada protein kakap merah dalam penelitian secara natural masih mengandung besi (Fe) sehingga dapat memicu oksidasi. Walaupun dengan asumsi kadar asam lemak dalam protein ikan sangat rendah sehingga

dapat diabaikan, oksidasi lipida yang dikatalisa oleh Fe secara natural masih dapat terjadi (Adams *dkk.*, 2001).

B. Mekanisme Oksidasi Protein

1. Reaksi oksidasi protein pada sistim biologis

Oksidan (radikal maupun non radikal pengoksidasi) dapat bereaksi dan mengakibatkan terjadinya kerusakan berbagai molekul yang berperan penting dalam sistim kehidupan (molekul dalam sistim biologis) seperti protein, lipid,kolesterol, DNA, RNA, karbohidrat maupun antioksidan (Davies, 2005; Hensley *dkk.*, 2004). Besarnya kerusakan oksidatif yang ditimbulkan tergantung pada konsentrasi target, kecepatan reaksi antara oksidan dan molekul target, lokasi atau letak dari molekul target dan oksidan, terjadinya kerusakan-kerusakan sekunder yang ditimbulkannya serta reaksi-reaksi perbaikan dan penstabilan yang terjadi dalam sisitim biologis atau target tersebut.

Protein merupakan target oksidasi yang penting karena merupakan komponen terbesar penyusun hampir semua sistim biologis, termasuk didalamnya bahan pangan (Andersen dan Odstal, 2001). Tetapan laju reaksi antara oksidan dengan berbagai makromolekul target dalam suatu sistim biologis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Tetapan laju reaksi dari radikal OH* dengan beberapa molekul dan antioksidan

| Substrat | kecepatan rata-rata (dm ³ mol ⁻¹ s ⁻¹) |
|---------------|--|
| DNA | 8 x 10 ⁸ |
| RNA | 1 x 10 ⁹ |
| Hyalurunan | 7 x 10 ⁸ |
| Asam linoleat | 9 x 10 ⁹ |
| Kolagen | 4 x 10 ¹⁰ |
| Albumin | 8 x 10 ¹⁰ |
| Antioksidan : | |

| Substrat | kecepatan rata-rata (dm³ mol⁻¹ s⁻¹) |
|-----------------|---|
| Askorbat | 1 x 10 ¹⁰ |
| GSH | 1 x10 ¹⁰ |
| Trolox C | 6,9 x 10 ⁹ |

Sumber : Davies (2003)

Berdasarkan Tabel 4 terlihat bahwa protein merupakan target yang potensial bagi radikal hidroksil (OH^{*}). Salah satu faktor penyebabnya adalah kandungan asam-asam amino penyusun protein tersebut. Dimana asam-asam amino tersebut merupakan target atau tempat dimana proses reaksi dari radikal tersebut dimulai baik pada rantai samping (*side chain*) maupun pada kerangka utama (*back bone*) protein. Tetapan laju reaksi (*rate constant*) dari berbagai asam amino penyusun protein dengan radikal hidroksil dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Tetapan laju reaksi asam-asam amino penyusun protein denganradikal hidroksil

| Substrat | Kecepatan rata-rata (dm³ mol⁻¹ s⁻¹) |
|-----------------|---|
| Alanin | 7,7 x 10 ⁷ |
| Arginin | 3,5 x 10 ⁹ |
| Asparagin | 4,9 x10 ⁷ |
| Asam | 7,5x10 ⁷ |
| aspartat | 3,4 x 10 ¹⁰ |
| Sistein | 2,1x 10 ⁹ |
| Sistin | 5,4 x 10 ⁸ |
| Glutamin | 2,3x10 ⁷ |
| Asam glutamate | 1,7 x 10 ⁷ |
| Glisin | 1,7 x 10 ⁷ |
| Histidin | 1,8 x 10 ⁹ |
| Isoleusin | 1,7 x 10 ⁹ |
| Leusin | 3,4 x 10 ⁸ |
| Lisin | 8,3 x 10 ⁹ |
| Metionin | 6,5 x 10 ⁹ |
| Penilalanin | 4,8 x 10 ⁸ |
| Prolin | 3,2 x 10 ⁸ |
| Serin | 5,1x 10 ⁸ |

| Substrat | Kecepatan rata-rata ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) |
|---------------|---|
| Treonin | $1,3 \times 10^{10}$ |
| Triptopan | $1,3 \times 10^{10}$ |
| Tirosin Valin | $7,6 \times 10^8$ |
| Cyclo(Gly)2 | $7,8 \times 10^8$ |
| N-Ac-Gly-Gly | $7,8 \times 10^8$ |

Sumber : Buxon dkk (1988)

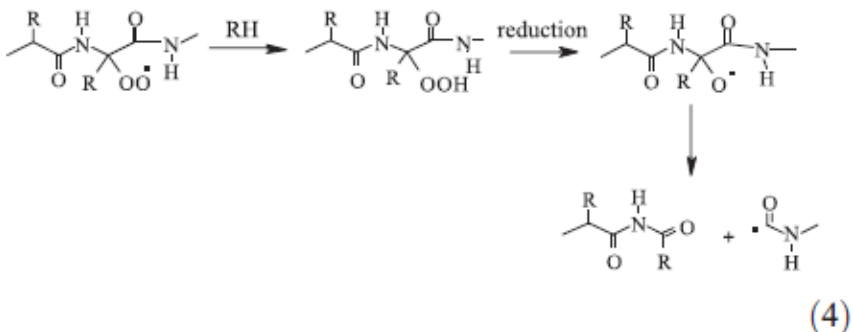
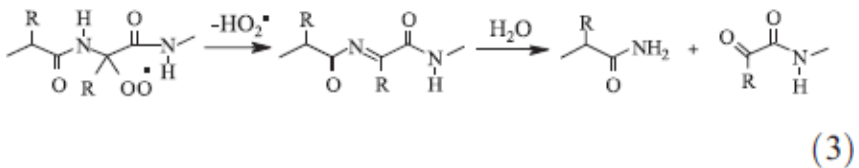
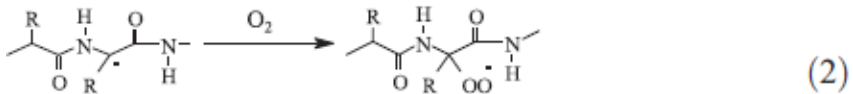
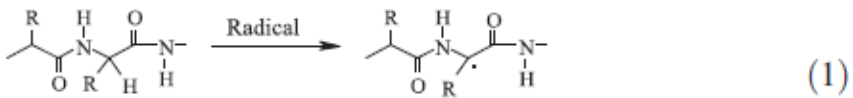
Berdasarkan Tabel 4, terlihat bahwa radikal hidroksil (OH^*) merupakan radikal oksigen yang sangat reaktif secara kimiawi. Radikal hidroksil ini sangat reaktif terhadap rantai samping asam-asam amino seperti triptofan, tirosin, histidin, metionin, sistein, fenilalanin, arginin, dan agak kurang reaktif pada asam-asam amino seperti alanin, aspartat dan asparagin (Piere, 1995; Berlet dan Stadman, 1997; Davies *dkk.*, 1987).

Shacter (2000) dan Oliver *dkk* (1987) mendefinisikan oksidasi protein adalah terjadinya modifikasi ikatan kovalen pada protein yang diinduksi baik secara langsung oleh senyawa-senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) maupun secara tidak langsung oleh produk-produk sekunder dari keadaan stress oksidatif. Sedangkan menurut Davies (2003), protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi (antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksil, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya), molekul- molekul pengoksidasi non radikal (oksigen singlet, HOCl, HOBr, peroksinitrit, O_3 dan sinar ultra violet), dan oleh reaksi-reaksi sekunder dari produk-produk intermediate oksidasi protein yang reaktif serta oleh produk oksidasi protein itu sendiri. Selain oleh senyawa oksigen reaktif, kerusakan oksidatif protein dapat jugadisebabkan oleh interaksi dengan produk-produk hasil oksidasi lipid seperti 4-hidroksinonenal dan malonaldehida (Nielson *dkk.*, 1985; Uchida dan Stadman, 1997; Berlett dan Stadman, 1997).

2. Kerangka utama protein sebagai reaksi oksidan

Kecepatan reaksi dari sebagian besar non radikal pengoksidasi dengan kerangka utama protein berjalan sangat lambat serta hanya

menyebabkan sedikit kerusakan pada tempat atau reaksi tersebut (Davies, 2005). Hal ini sangat berbeda dengan radikal-radikal. Radikal-radikal akan bereaksi sangat cepat dengan kerangka utama dari protein, proses serangan radikal tersebut dimulai dengan mengabstraksi atom hidrogen pada atom karbon- α yang akhirnya dapat menyebabkan terjadinya fragmentasi pada kerangka utama protein tersebut. Davies (2005) mengilustrasikan mekanisme serangan radikal pada kerangka utama protein seperti pada Gambar 1.

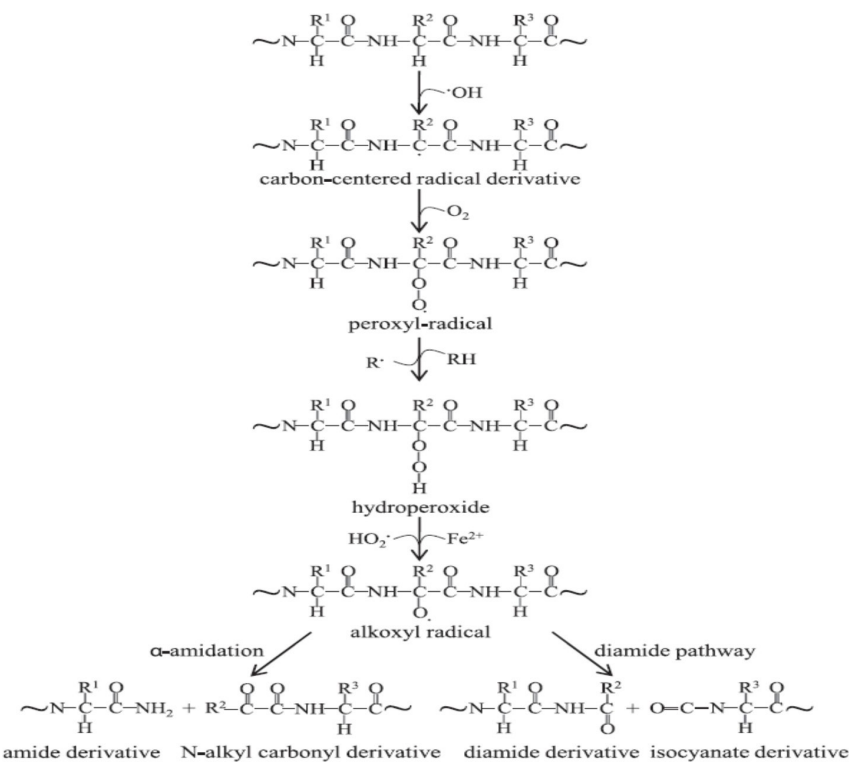


Gambar 1. Radikal bebas oksigen sebagai mediasi terjadinya oksidasi padakerangka utama protein (Davies, 2005).

Berdasarkan Gambar 1 diatas terlihat bagaimana mekanisme terbentuknya radikal karbon- α baik secara langsung maupun

tidak langsung serta dihasilkannya produk-produk oksidasi yang lebih lanjut seperti terbentuknya peroksil radikaldengan kehadiran oksigen. Reaksi berantai ini berjalan terus dan berujung pada terjadinya fragmentasi pada kerangka utama protein tersebut.

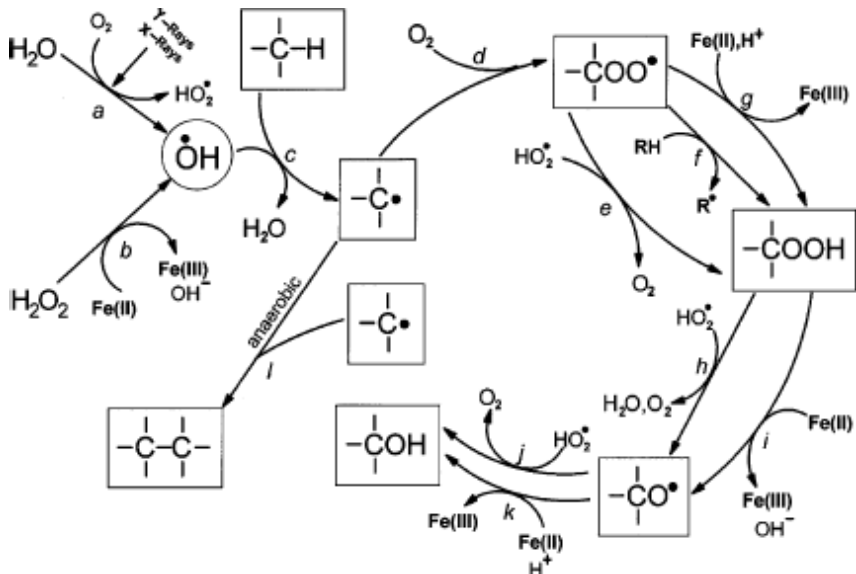
Mekanisme reaksi radikal pada kerangka utama protein juga dikemukakan oleh Hohn *dkk.*, (2013), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme reaksi radikal pada kerangka utama protein(Hohn *dkk.*, 2013)

Secara lebih spesifik dan terinci Stadman dan Levine (2003) menjelaskan mekanisme reaksi radikal pada kerangka utama protein seperti pada Gambar 3. Mereka menyatakan bahwa reaksi radikal dimulai dengan mengabstraksi atomhidrogen pada atom karbon- α pada kerangka utama protein. Hal spesifik yang ditunjukkan dalam penelitian ini mereka adalah atom hidrogen yang diabstraksi berasal

dari rantai samping alifatik (*aliphatic side chain*) residu asam-asam amino hidrofobik.



Gambar 3. Mekanisme reaksi radikal bebas pada kerangka utama protein (Stadman dan Levine, 2003)

Reaksi oksidatif pada suatu kerangka protein diinisiasi oleh radikal hidroksil (OH^*) yang mengabstraksikan atom hidrogen dari asam amino pada suatu kerangka protein sehingga membentuk suatu radikal pusat (reaksi c). Radikal karbon pusat yang terbentuk akan cepat bereaksi dengan oksigen sehingga membentuk radikal peroksil (reaksi d). Radikal-radikal ini akan dikonversi menjadi alkil peroksida melalui reaksi protonasi radikal superoksida (reaksi e) atau melalui abstraksi atom hidrogen dari molekul lain (reaksi f), yang kemudian diikuti oleh pembentukan radikal alkoksil (reaksi h). Radikal-radikal yang terlibat dalam reaksi berantai ini (OH^* maupun HO_2^*) dapat dihasilkan melalui radiasi ionisasi dan juga melalui hasil pemecahan H_2O_2 oleh logam Fe dan Cu (reaksi b).

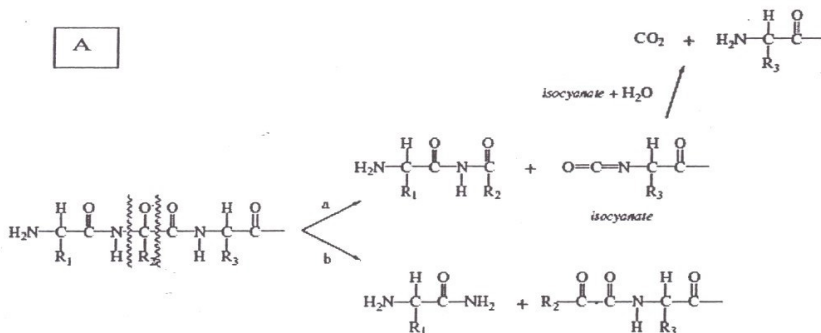
Keterlibatan logam-logam transisi (Fe dan Cu) tidak hanya sebagai pemicu timbulnya radikal, tetapi juga terlibat langsung dalam reaksi berantai tersebut. Sebagai contoh, logam Fe dapat menggantikan

peran radikal (HO_2^*) dalam reaksi yang mengakibatkan terbentuknya alkil peroksida, alkoksil radikal maupun derivat hidrosil protein (reaksi g, i, k). Radikal alkil, radikal alkil peroksil dan intermediate radikal alkoksil yang dihasilkan dalam jalur tersebut dapat beraksi dengan residu-residu asam amino dari protein yang lain guna membentuk lagi radikal karbon pusat yang baru.

Radikal karbon pusat yang baru ini selanjutnya akan melakukan reaksi yang sama seperti yang diilustrasikan pada Gambar 2.3, sehingga terbentuk suatu mekanisme reaksi oksidasi yang berantai dalam suatu kerangka protein. Bila keberadaan oksigen pada reaksi dapat dicegah (bila dalam keadaan tanpa

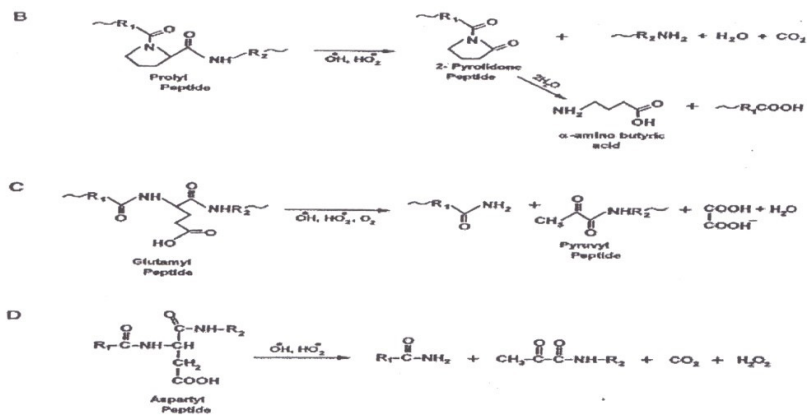
oksigen) maka radikal karbon pusat yang terbentuk akan bereaksi dengan radikal karbon pusat yang lainnya sehingga membentuk ikatan silang protein-protein (*protein-protein crosslinkage*).

Berdasarkan Gambar 2.4, juga terlihat bahwa terjadinya oksidasi protein oleh radikal-radikal dapat berdampak langsung pada terjadinya pemecahan atau pemutusan ikatan peptide dalam kerangka utama protein tersebut. Menurut Garrison (1987), radikal alkoksil maupun derivat-derivat alkil peroksida yang terbentuk dapat mengalami pemecahan melalui dua jalur yaitu jalur diamidasi atau α -amidasi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pemecahan ikatan peptida melalui jalur a. diamidasi dan b. α -amidasi

Selanjutnya Garrison (1987) menyatakan bahwa pemecahan ikatan peptida dapat juga terjadi akibat serangan senyawa-senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) pada sisi rantai glutamil dan aspartil yang dapat mengakibatkan terbentuknya derivate N-pyruv (reaksi C dan D, Gambar 5). Abstraksi atom Hidrogen pada γ -atom karbon dan Glutamil yang kemudian diikuti oleh reaksi-reaksi berantai menunjukkan mekanisme pemecahan ikatan peptida yang dapat menyebabkan terbentuknya asam oksalat dan derivate N-piruvil. (reaksi C dan D, Gambar 5).



Gambar 5. Keterlibatan radikal dalam pemecahan ikatan peptida dalam kerangkautama protein. Reaksi B : residu Prolil ; C: residu glutamil dan Reaksi D: residu aspartil (Garison, 1987).

- Oksidasi protein oleh molekul-molekul radikal pengoksidasi
- Oksidasi protein oleh molekul-molekul radikal pengoksidasi dibagi atas; rantai samping alifatik dan rantai samping aromatik

C. Rantai Samping Alifatik

Radikal-radikal yang sangat reaktif (seperti OH^*) biasanya sangat reaktif terhadap residu rantai samping alifatik dari asam-asam amino penyusun protein. Mayoritas dari reaksi berantai radikal-radikal tersebut diawali dengan terjadinya abstraksi atom hydrogen sehingga terbentuk produk-produk intermediate berupa radikal karbon pusat.

Menurut Davies (2005), sebagian produk-produk reaksi oksidan pada rantai alifatik adalah berupa peroksida-peroksida, alkohol dan senyawa karbonil. Berdasarkan Tabel 5, dapat dilihat dampak reaksi oksidan terhadap beberapa rantai samping alifatik asam-asam amino penyusun protein.

Tabel 4. Produk-produk oksidasi akibat reaksi pada rantai samping alifatik dan yang mengandung sulfur asam-asam amino penyusun protein

| Asam Amino | Produk-produk Oksidasi |
|---------------|--|
| Asam Glutamat | Hidroperoksida (tidak stabil) |
| Leusin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol Ketoisocaproic acid ovalerat acid ovaleraldehyde ovaleraldehyde oxime senyawa karbonil |
| Glisin | Aminomalonic acid |
| Valin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol Senyawa karbonil |
| Lisin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol Chloramines Senyawa karbonil |
| Prolin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol 5-hidroxy-2 aminovaleric acidSenyawa karbonil |
| Arginin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol 5-hidroxy-2 aminovaleric acidChloramines bromamines Senyawa karbonil |
| Isoleusin | Hidroperoksida (tidak stabil)Alkohol Senyawa karbonil |
| Metionin | Metionin sulfoksida Metionin sulfon |
| Sistein | Sistin (disulfide) Oxyacids ($\text{RSO}_2\text{H}_2\text{RSO}_3\text{H}$)Sulfonamides Sulfenyl chlorides |

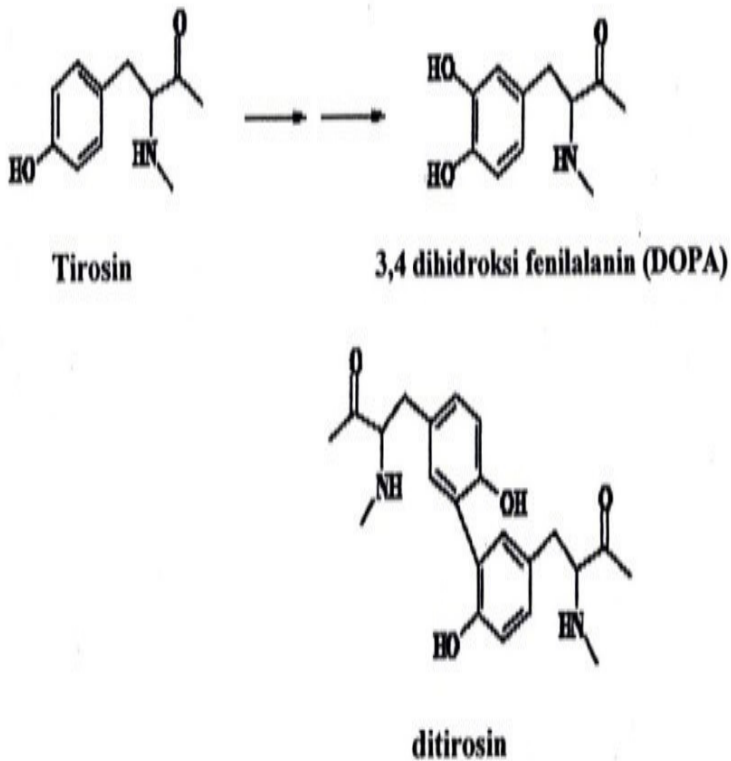
Sumber : Davies (2005)

Beberapa studi telah dilakukan guna mempelajari terbentuknya hidroperoksida yang merupakan salah satu produk oksidasi dari asam-asam amino, peptida dan protein. Hasil penelitian tersebut antara lain menunjukkan bahwa hidroperoksida yang terbentuk tergantung pada rantai samping asam amino yang menjadi target serta sistim oksidasi yang menimbulkan reaksi oksidasi tersebut, seperti misalnya radiasi sinar γ , X, Ultra Violet (UV), *visible light* dengan bantuan sensitizier, sistim katalis logam (pembangkit radikal OH^* , RO^*), pembangkit radikalperoksil (*thermolabile azo-compound*/AAPH) dan heme-protein serta *peroxynitrite* (Simpson *dkk.*, 1992). Dekomposisi lebih lanjut dari hidroperoksida-hidroperoksida tersebut akan membentuk berbagai radikal seperti radikal alkoksil, radikal karbon pusat, radikal superoksida serta alkohol dan senyawa karbonil (Davies *dkk.*, 1995).

D. Rantai Samping Aromatik

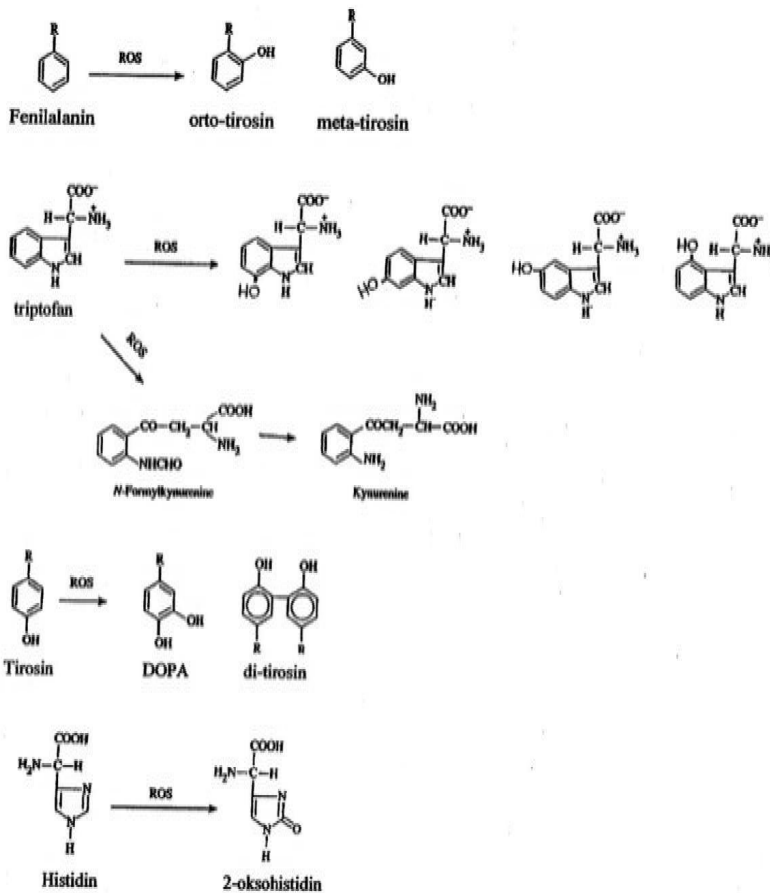
Umumnya reaksi antara oksidan dengan rantai samping aromatik asam- asam amino penyusun protein adalah berupa reaksi adisi. Reaksi substitusi hanya terjadi pada histidin dengan HOCl yang menghasilkan N-klorinasi.

Reaksi antara radikal-radikal, maupun oksidan lainnya (*peroxydase* – H_2O_2) dengan tirosin akan menghasilkan radikal *tyr-phenoxyl*, ini dapat terjadi karena oksidasi langsung yang terjadi pada cincin aromatik serta deprotonasi pada gugus hidroksil atau melalui reaksi adisi-eliminasi bila diserang oleh radikal hidroksil. Radikal-radikal yang dihasilkan dapat bereaksi dan membentuk *dimmer* sehingga akan terjadi ikatan silang diantara molekul-molekul tersebut sehingga mengakibatkan terbentuknya *dityrosine* (Davies, 2003), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Dampak serangan radikal terhadap tirosin (Davies, 2003).

Menurut Stadman dan Levine (2003), rantai samping aromatik dari asam- asam amino penyusun protein juga merupakan target yang potensial dari berbagai senyawa oksigen reaktif. Seperti yang diilustrasikan pada gambar 7, fenilalanin dapat teroksidasi sehingga membentuk derivate orto dan meta-tirosin. Residu tirosin akan dikonversi menjadi derivate 3,4- *dihydroxyphenylalanine*(DOPA) dan juga *dityrosin*. Residu triptofan akan dikonversi menjadi derivate 2-,4-,5-,6-,7-hydroxyl serta N- *formylkynurenine* dan *kynurenine*.



Gambar 7. Oksidasi rantai samping aromatic asam-asam amino penyusun protein (Stadman dan Livine, 2003)

Sejumlah produk oksidasi yang dihasilkan akibat serangan oksidan pada rantai aromatik dari asam-asam amino penyusun protein dapat dilihat pada Tabel 6.

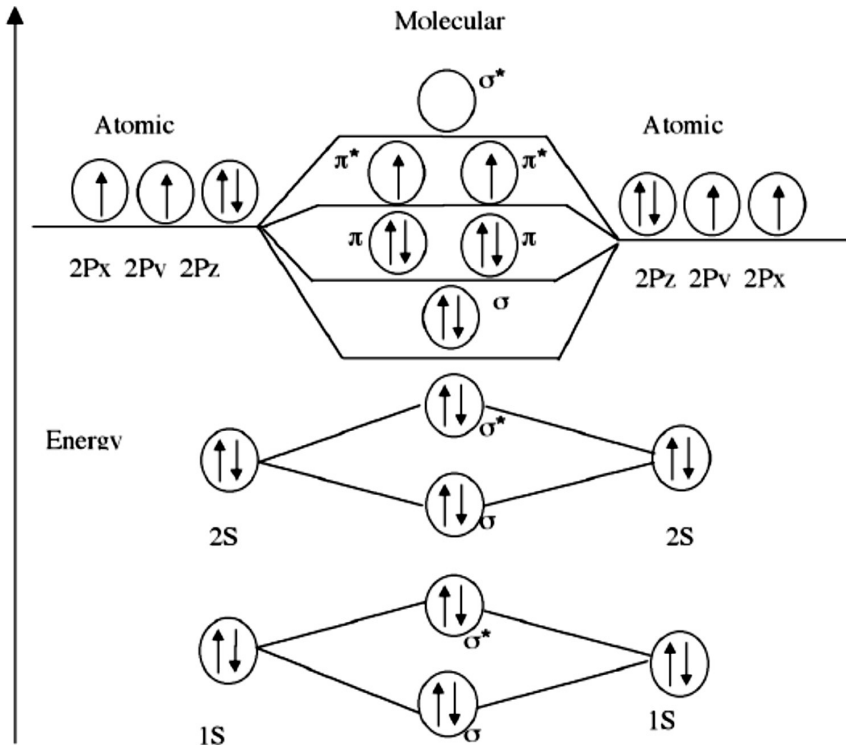
Tabel 5. Produk-produk oksidasi serangan oksigen pada rantai samping aromatik

| Asam amino | Produk-produk oksidasi |
|-------------------|--|
| Fenilalanin | Orto-tirosin (2-hidroksifenilalanin) Meta-tirosin (3-hidroksifenilalanin)Tirosin |
| Tirosin | 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA)(tidak stabil) Ditirosin 3-klorotirosin 3,5diklorotirosin3-bromotirosin 3,5-dibromotirosin Hidroperoksida (tidak stabil-dari $^1\text{O}_2$) Alkohol and cyclized products (dari $^1\text{O}_2$) |
| Triptofan | N-formylkynurenineKynurenine 5-hidroksitriptofan7-hidroksitriptofan Hidroperoksida (tidak stabil-dari $^1\text{O}_2$) Alkohol and cyclized products (dari $^1\text{O}_2$) |
| Histidin | 2-oksohistidin Chlorinated materials (tidak stabil-dari HOCl) Hidroperoksida (tidak stabil-dari $^1\text{O}_2$) Alkohol and cyclized products (dari $^1\text{O}_2$) |

Sumber : Davies (2005)

BAB III

FAKTOR-FAKTOR PENYEBAB OKSIDASI PROTEIN

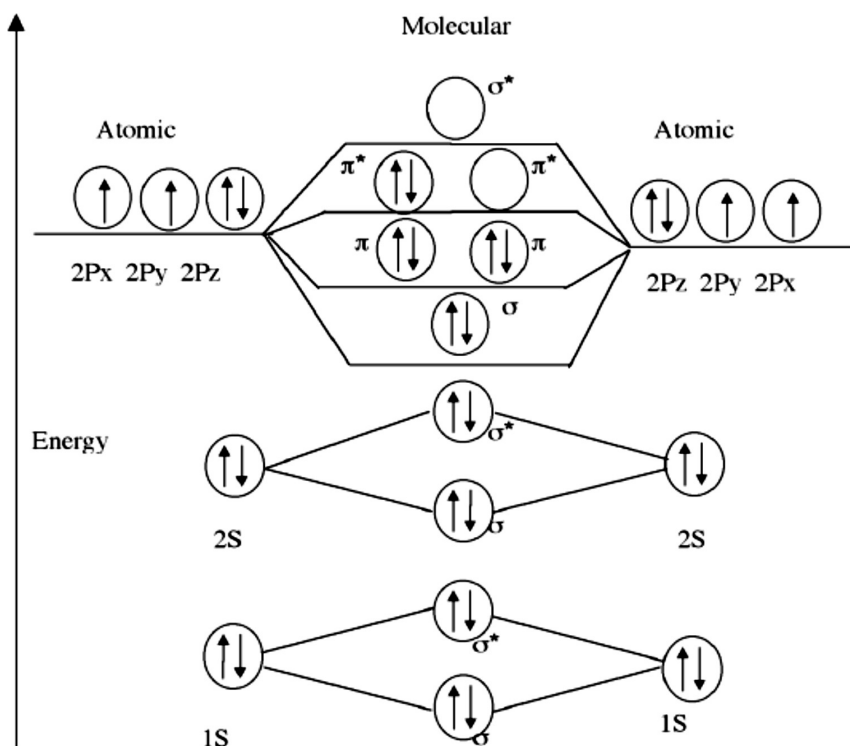


Gambar 8. Orbital molekul oksigen triplet ($^3\text{O}_2$) (Min dan Boff, 2002)

Oksigen triplet merupakan bentuk oksigen paling banyak dan stabil. Perbedaan sifat kimia antara oksigen triplet dan oksigen singlet dapat digambarkan melalui orbital molekul keduanya (Gambar 8). Multiplisitas perputaran yang digunakan untuk menerangkan tingkat putaran molekul digambarkan sebagai $2S + 1$, dimana S adalah jumlah total putaran kuantum. Jumlah total putaran kuantum (S) untuk oksigen triplet adalah 1. Tingkatan oksigen triplet memiliki

multiplisitas putaran 3 dan paramagnetik dengan sifat radikal (Min dan Boof, 2002).

Pada protein oksigen triplet dapat langsung bereaksi dengan komponen radikal lainnya. Namun demikian sebagian besar komponen protein adalah nonradikal dan dalam bentuk oksigen singlet. Oksigen triplet dipicu oleh pembentukan komponen protein radikal. Komponen radikal bereaksi dengan oksigen triplet diradikal. Orbital molekul dari oksigen singlet berbeda dengan oksigen triplet dimana elektron pada orbital anti-bonding π^* berpasangan (Gambar 9).



Gambar 9. Orbital molekul oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) (Min dan Boff, 2002)

B. Oksigen Singlet

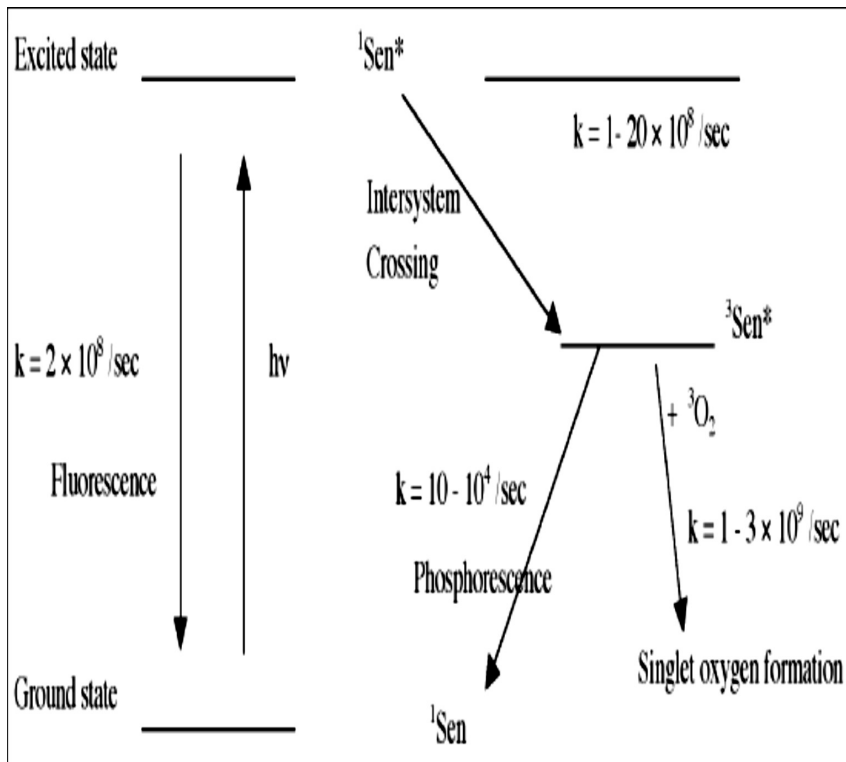
Salah satu molekul non radikal yang sangat reaktif dan bersifat elektrofilik adalah oksigen singlet. Oksigen singlet dapat terbentuk secara kimiawi, enzimatis, dan fotokimiawi. Beberapa mekanisme pembentukan oksigen singlet belum sepenuhnya terbukti secara ilmiah dan masih dipertanyakan sehingga masih diperlukan penelitian terperinci lebih lanjut untuk berbagai mekanisme pembentukan oksigen singlet dalam makanan. Elektron dalam molekul oksigen dari kondisi triplet (*ground state*) tidak dapat secara langsung diubah menjadi kondisi oksigen singlet.

Untuk itu diperlukan tiga cara guna menghasilkan oksigen singlet, yakni 1. melalui dekomposisi hidrogen peroksida dengan menggunakan hipoklorit anion. metode ini menghasilkan oksigen singlet dengan kadar yang tinggi; 2. menggunakan radiasi gelombang mikro (2450 Hz) untuk mengeksitasi elektron oksigen triplet menjadi oksigen singlet; 3. menggunakan sensitizer dan cahaya yang melibatkan proses perpindahan energi dari sensitizer dalam kondisi triplet kepada molekul oksigen triplet. Mengingat sensitizer triplet memiliki cukup energi, pemindahan energi melalui pertukaran elektron bias berlangsung secara efisien.

Sejumlah penelitian yang menguji pengaruh beberapa pewarna makanan sintetik terhadap pembentukan hidroperoksida asam linoleat yang diberi cahaya selama 8 jam menunjukkan bahwa pewarna ros bengel, eritrosin dan phloxine mampu meningkatkan angka peroksida secara nyata. Selanjutnya disebutkan bahwa ros Bengal, eritrosin dan phloxine adalah fotosensitizer yang efektif dalam oksidasi. Pembentukan oksigen singlet secara kimia dengan sensitizer, cahaya, dan oksigen triplet menjadi mekanisme paling banyak untuk menghadirkan oksigen singlet dalam makanan.

Sensitizer akan menyerap UV atau energi radiasi visible secara cepat dan menjadi tidak stabil, tereksitasi, ke molekul tingkat singlet. Fotosensitizer singlet tereksitasi kehilangan energinya oleh konversi

internal, emisi cahaya, atau persilangan antar sistem seperti terlihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Mekanisme pembentukan oksigen singlet secara kimiawi denganbantuan sensitizer, cahaya, dan oksigen triplet (Min dan Boff, 2002)

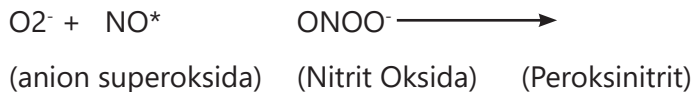
Oksigen singlet dapat langsung bereaksi dengan senyawa yang kaya akan elektron yang mengandung ikatan rangkap tanpa terlebih dahulu membentuk radikal bebas (Min dan Boff, 2002). Oksigen singlet dapat mengoksidasi peptida dan protein yang akan mengakibatkan kerusakan terutama pada residu-residu asam amino seperti sistein, metionin, triptofan, tirosin dan histidin sehingga membentuk peroksida-peroksida dari protein maupun asam-asam amino tersebut, dimana asam-asam amino tersebut adalah merupakan asam-asam amino berikatan rangkap serta kaya akan elektron (Davies dkk., 2000).

Pada saat asam-asam amino penyusun protein tersebut bereaksi dengan oksigen singlet maka protein akan teroksidasi dan akan kehilangan sifat-sifat fungsionalnya (Min dan Boff, 2002). Kecepatan reaksi oksigen singlet dengan protein tergantung pada pH, suhu dan tetapan dielektrik serta keberadaan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap oksigen singlet. Beberapa reaksi antara asam-asam amino tersebut dengan molekul oksigen singlet dapat dilihat pada reaksi-reaksi berikut ini: Derivat-derivate protein karbonil diantaranya seperti N- *formylkynurenine* dan *kynurenine* juga dihasilkan akibat reaksi oksigen singlet terhadap triptofan.

Selanjutnya Whang dan Peng (1998) menyatakan bahwa mioglobin dan protein-protein heme yang lain adalah merupakan fotosensitizer utama yang dapat menghasilkan oksigen singlet sehingga dapat menyebabkan terjadinya oksidasi dalam daging. Mioglobin dan oksimioglobin keduanya memiliki kemampuan untuk mengabsorpsi energi cahaya sehingga menghasilkan pembentukan metmioglobin melalui suatu reaksi fotooksidasi. Protein sangat mudah teroksidasi menghasilkan berbagai macam prekursor pembawa citarasa (King, 1996).

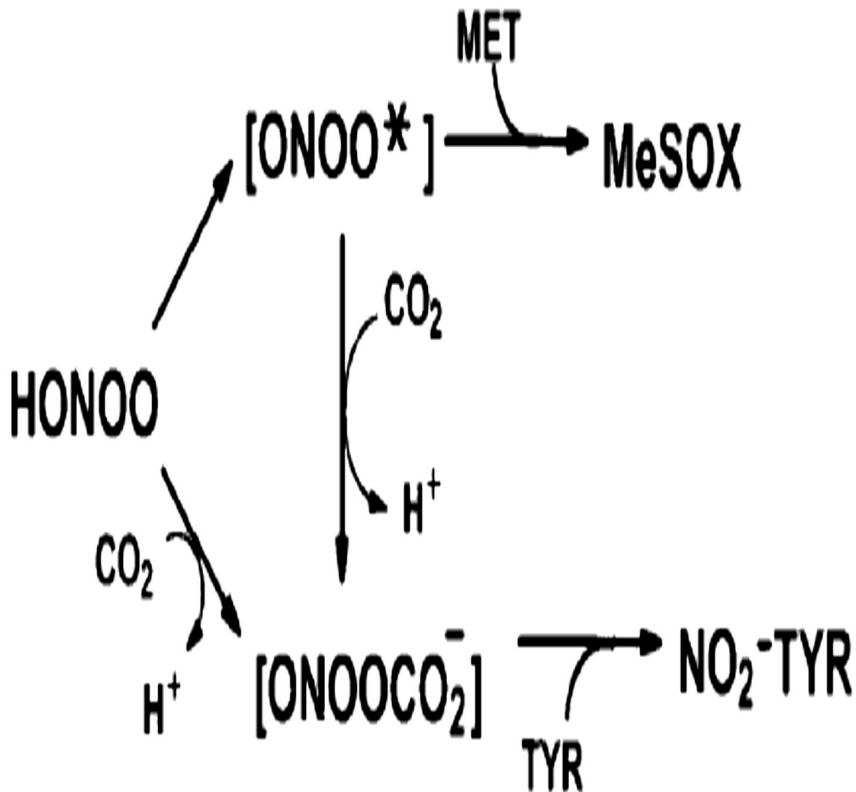
C. Peroksinitrit

Nitrit oksida (NO*) yang dihasilkan dari metabolisme asam amino arginin dapat cepat bereaksi dengan anion superoksida sehingga membentuk peroksinitrit. (Radi *dkk.*, 1991). Reaksinya adalah sebagai berikut :



Asam amino sistein dan metionin merupakan asam amino yang sangat mudah diserang oleh peroksinitrit. Disamping kedua asam amino tersebut, tirosin dan triptofan juga sangat selektif untuk dinitrasi oleh peroksinitrit (Berlett dan Stadman, 1997; Tien *dkk.*, 1999). Kemampuan peroksinitrit untuk melakukan nitrasi dan oksidasi terhadap asam amino tirosin dan metionin pada protein tergantung

pada kesediaan CO_2 . Sebab dengan adanya CO_2 , peroksinitrit akan berada dalam keadaan kesetimbangan dengan bentuk yang diaktivasi. Proses nitration tirosin dan oksidasi metionin dengan keberadaan CO_2 oleh peroksinitrit secara skematis digambarkan sebagai berikut :



Gambar 11. Proses nitration tirosin dan oksidasi metionin oleh peroksinitrit (Berlett dan Stadman, 1997)

BAB IV

PROSES VALIDASI MODEL

KINETIKA OKSIDASI

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kakap (*Lutjanus sp*) yang dibeli dari Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Tenda, Kecamatan Dumbo Raya Kota Gorontalo, Provinsi Gorontalo. Penelitian ini digunakan untuk suatu pemodelan. Ikan kakap (*Lutjanus sp*) yang masih segar disiangi dan diambil dagingnya, sementara bagian kepala, insang, tulang, dan bagian tubuh lainnya dibuang. Daging ikan tersebut kemudian dicuci dan dibilas dengan air es untuk menghilangkan darah serta kotoran lainnya. Selanjutnya dilakukan *filleting* (penyayatan daging rusuk secara membujur sehingga menghasilkan daging tanpa tulang) terhadap daging ikan untuk dilakukan analisis terhadap sifat dan karakteristik protein dan lemaknya.

Bahan kimia yang digunakan seperti asam triclorida (TCA) 5%, asam tiobirbaturat (TBA) 0,02%, petroleum eter, benzene, feri klorida (FeCl_2) 0,02 M, ammonium thiosulfat, methanol, asam klorida pekat, 2,4 dinitriphenil hidrasil (DNPH), KOH 1N, aquades, kloroform, NaOH, natrium sulfat (Na_2SO_4), hexan, bron triflorida (BF_3) dan aseton.

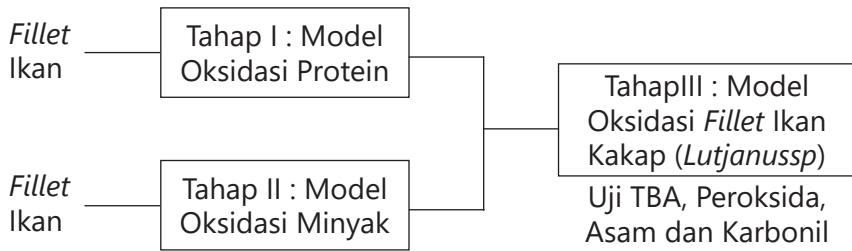
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gas kromatografi (GC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Spectrofotometer*, *Freeze dries*, termokopel, kotak penyimpanan, inkubator, lemari es, *soxhlet*, termometer, oven, kompor listrik, labu *kheldhal*, neraca analitik, buret, *erlenmeyer*, *stirer/shaker*, pipit, kamar gelap, tabung reaksi, *waring blender*, penangas air, dan alat destilasi.

Dalam menentukan kinetika sebelumnya data-data yang diperoleh disusun dalam tabel sesuai dengan suhu dan waktu. Selanjutnya, ditentukan besarnya nilai $\ln C$ produk oksidasi dari lemak dan protein dari sampel ikan yang disimpan pada berbagai suhu dan waktu. Dari grafik $\ln C$ versus t (jam) maka dapat diketahui persamaan regresi $y = a + bx$ untuk masing-masing suhu dan dapat ditentukan slope b yang menunjukkan konstanta k . Kemudian dibuat grafik $\ln k$ versus $1/T$ dimana T merupakan nilai suhu absolut yang dinyatakan dalam Kelvin sehingga diperoleh persamaan regresi $y = a + bx$. Dari persamaan $\ln k = \ln A - E_a/R \cdot 1/T$ maka besarnya slope b menunjukkan besarnya E_a/R sehingga dapat ditentukan besarnya E_a (Energi aktivasi).

Langkah-langkah yang dilakukan untuk melakukan validasi model adalah sebagai berikut :

Analisis kadar karbonil, protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) dan *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) terpilih untuk mendapatkan data empiris. Substitusi kadar, protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) dan *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) tersebut ke dalam model matematika *arrhenius* lengkap dengan konstanta modelnya untuk mendapatkan data prediksi. Evaluasi kevalidan model dilakukan dengan mengkaji koefisien determinan yang dihasilkan antara data empiris dan data prediksi.

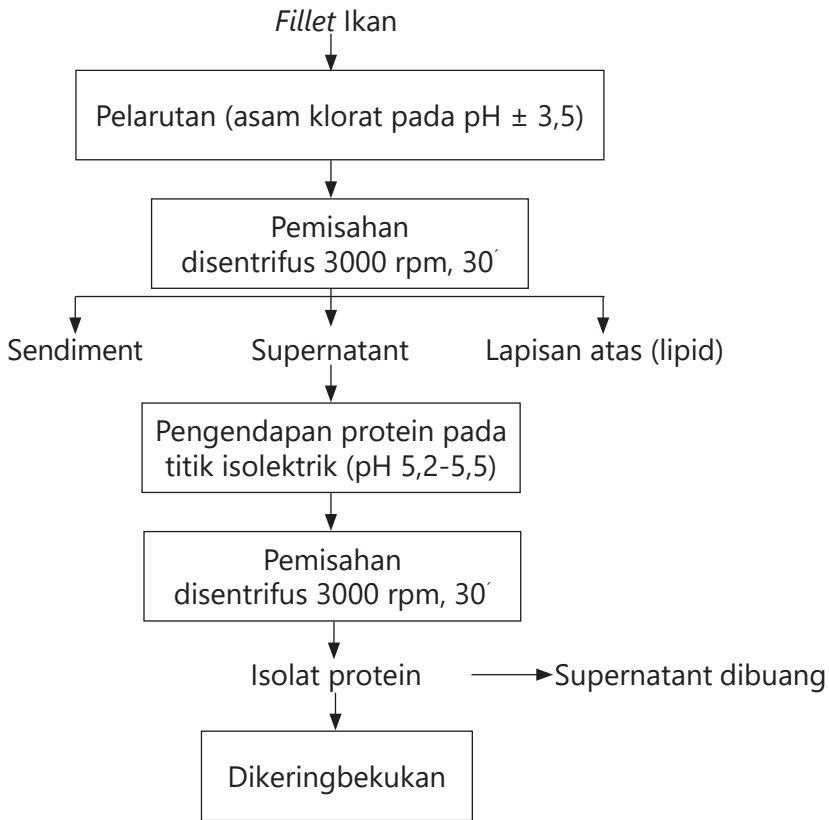
Penelitian ini dilakukan dalam Dua tahapan, pertama yakni kajian terhadap model kinetika oksidasi protein daging ikan kakap merah (*Lutjanus sp*). dan tahapan kedua adalah model kinetika oksidasi *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*). Secara keseluruhan, tahapan-tahapan penelitian tersebut serta jalannya penelitian dapat di lihat diagram alir tahapan penelitian pada Gambar 12.



Gambar 12. Tahapan Penelitian Model Kinetika Oksidasi *Fillet Ikan Kakap (Lutjanus sp)* dengan Pendekatan Kombinasi Protein dan Lemak

Melihat tingkat oksidasi protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) dari berbagai suhu dan lama penyimpanan. Memperoleh data kerusakan protein ikan kakap (*Lutjanus sp*). Memperoleh konstanta kinetika oksidasi protein ikan kakap (*Lutjanus sp*)

Hancuran daging ikan dan air berbanding (1:7). Kemudian ditambahkan asam klorida (HCl) untuk menurunkan pH daging ikan sampai $\pm 3,5$. Setelah itu, disentrifugasi untuk memperoleh bagian yang larut yang disebut protein terlarut. Tambahkan lagi HCl untuk memperoleh pH isoelektrik (5,5) dan disentrifugasi lagi untuk memperoleh endapan isolate protein akhir. Setelah isolate protein akhir diperoleh, disimpan dalam *freezer* dan dikering-bekukan dalam pengering beku selanjutnya, sampel dianalisis (Gambar 13). Parameter pengamatan Protein Karbonil, Profil Asam Amino



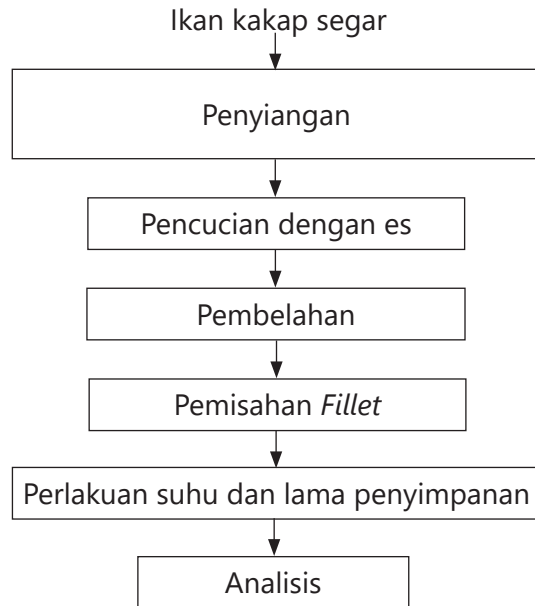
Gambar 13. Diagram alir isolasi protein ikan kakap (*Lutjanus sp*)

Melihat tingkat oksidasi *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) dari berbagai suhu dan lama penyimpanan. Memperoleh data kerusakan *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*). Memperoleh konstanta kinetika oksidasi *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*)

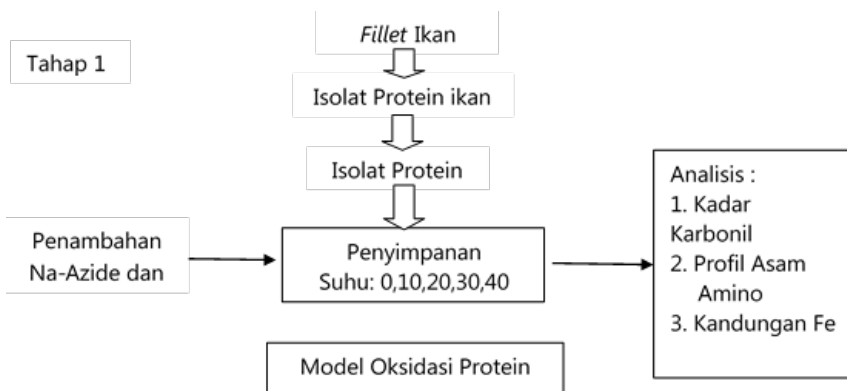
Ikan kakap (*Lutjanus sp*) yang masih segar disiangi untuk diambil dagingnya sementara, insang, kepala, tulang, dan bagian tubuh lainnya dibuang.

Daging ikan tersebut kemudian dicuci dan dibilas dengan air es untuk menghilangkan darah serta kotoran lain. Selanjutnya, dilakukan pembelahan dimulai dari kepala ke arah ekor tanpa menyebabkan bagian punggung terpotong. Selanjutnya lagi di

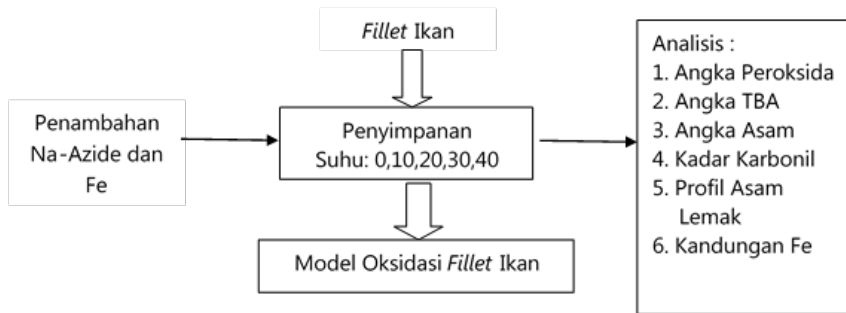
lakukan *filleting* yakni penyayatan daging rusuk secara membujur sehingga menghasilkan daging tanpa tulang dan siap dilakukan penyimpanan serta analisis (Gambar 14). Parameter pengamatan Protein Karbonil dan Angka Asam



Gambar 14. Diagram alir isolasi *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*)



Tahap 2



Gambar 15. Desain Penelitian Model Kinetika Oksidasi *Fillet Ikan Kakap (Lutjanus sp.)* dengan Pendekatan Oksidasi Protein Ikan

BAB V

KINETIKA OKSIDASI PROTEIN DAN EVALUASI SENSORIS FILLET IKAN

A. Kinetika Oksidasi Protein Ikan

1. Proksimat *Fillet* Ikan Kakap (*Lutjanus sp*)

Hasil analisis proksimat dan kadar Fe *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) disajikan pada Tabel 7. Kadar protein ikan kakap segar dalam penelitian ini adalah (18,77%; BB) dibanding yang dilaporkan oleh Nurnadia *dkk.*, (2011), Gooch *dkk.*, (2013), dan El-Faer *dkk.*, (2012), masing-masing 20,45%, 19,7% dan 19,30%. Kandungan protein kasar pada ikan segar (18,77%; BB) dan pada protein ikan (88,92%; BK), hal ini menunjukkan bahwa 95,83% protein ikan berada pada fraksi protein murni (isolat).

Tabel 6. Proksimat, Protein Ikan dan Kadar Fe Ikan Kakap
(*Lutjanus sp*)*

| Daging Segar | | | |
|--|------------|------------|-----------------------|
| Parameter | Kadar (BB) | Kadar (BK) | Isolat (Protein Ikan) |
| Kadar air (%; BB) | 78,39 | - | 7,20 |
| Kadar abu (%; BK) | 1,58 | 4,11 | 1,46 |
| Protein (%; BK) | 18,77 | 88,92 | 89,1 |
| Lemak (%; BK) | 1,95 | 4,81 | 0,9 |
| Karbohidrat <i>by difference</i> (%; BK) | 0,30 | 2,16 | 0 |
| Fe (ppm) | 121,47 | - | 108,95 |

*Keterangan: data berasal dari 3x ulangan

Perbedaan kandungan protein ikan sangat dipengaruhi oleh kesegaran bahan ikan yang digunakan sebagai faktor kritis dalam menghasilkan isolat, metode isolasi/ekstraksi yang digunakan,

homogenisasi daging saat prosesing, rasio ikan dan pelarut (viskositas) yang digunakan, lama ekstraksi, waktu dan suhu prosesing dan kelarutan protein (Shaviklo, 2006). Berdasarkan Tabel 4.1. protein ikan mengandung Fe sebesar 89,69% dari total Fe daging segar ikan (121,47 ppm).

Okada (2010) menjelaskan warna daging ikan disebabkan kandungan Fe dalam daging ikan sangat tinggi karena kaya hemoprotein (80%) terutama mioglobin dan hemoglobin. Dengan asumsi berdasarkan Okada (2010), maka secara natural daging ikan kakap (*Lutjanus sp*) adalah daging ikan berwarna putih. Kemungkinan terjadi proses oksidasi pada daging tersebut dapat terjadi karena daging ikan kakap (*Lutjanus sp*) masih mengandung Fe.

2. Profil Asam Amino Protein Ikan Kakap (*Lutjanus sp*)

Tabel 7. Hasil analisis komposisi* asam amino protein ikan kakap (*Lutjanus sp*.)

| NO | Asam amino (%) | Sebelum penyimpanan | Setelah penyimpanan pada suhu 40°C |
|-----------|-----------------------|----------------------------|---|
| 1 | Asam aspartat (Asp) | 21,96 | 4,00 |
| 2 | Asam glutamat (Glu) | 29,74 | 7,12 |
| 3 | Serin (S) | 2,17 | 2,59 |
| 4 | Glisin (Gly) | 3,08 | 2,91 |
| 5 | Alanin (Ala) | 4,65 | 4,69 |
| 6 | Histidin (His) | 1,54 | 8,22 |
| 7 | Arginin (Arg) | 4,72 | 5,67 |
| 8 | Tirosin (Tyr) | 1,40 | 3,55 |
| 9 | Metionin (Met) | 1,00 | 0,79 |
| 10 | Valin (Val) | 1,41 | 2,51 |
| 11 | Phenilalanin (Phe) | 1,25 | 2,04 |
| 12 | Isoleusin (Ile) | 1,33 | 2,46 |
| 13 | Leusin (Leu) | 6,47 | 5,21 |
| 14 | Lisin (Lys) | 7,45 | 6,83 |
| 15 | Treonin (Thr) | 0,09 | 2,60 |
| | Total | 88,21 | 61,20 |

* Dianalisis dengan HPLC Shimadzu SPD-M10A (Kromatogram standar asam amino)

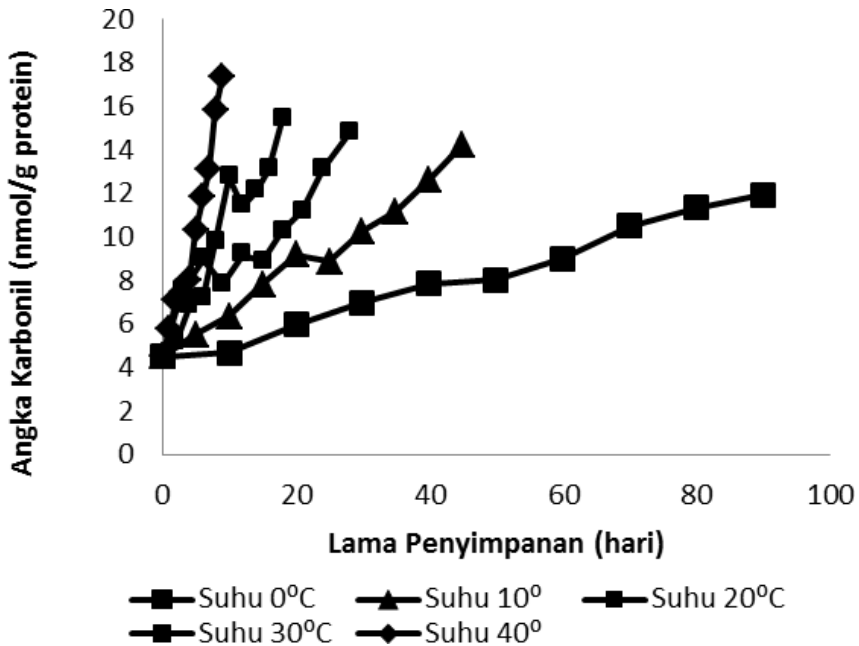
Berdasarkan Tabel 8. pada penyimpanan 40°C persentase asam amino mengalami penurunan masing-masing yakni asam aspartat, asam glutamat, glisin, metionin, leusin dan lisinhal ini disebabkan karena adanya deaminasi pada asam amino yang terdapat pada protein ikan (Ruiz-Capillas dan Moral, 2002). Pada penyimpanan 40°C juga terjadi kenaikan persentase asam amino masing-masing yakni serin, alanin, histidin, arginin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin dan treonin. Menurut Yassoralipour dkk., (2013) kenaikan persentase asam amino selama penyimpanan disebabkan karena hidrofobik asam amino ketika protein ikandisimpan dalam pengontrolan suhu atau atmosphere.

Berdasarkan Tabel 8, terlihat juga bahwa protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) memiliki kandungan asam amino yang rentan terhadap kerusakan oksidatif seperti histidin, alanin, tirosin, metionin, valin, dan phenilalanin. Menurut Konusu dan Yamaguchi, (2013); Sikorsi, (2011) bahwa protein ikan mengandung 18 asam amino baik esensial maupun non esensial. Asam-asam amino tersebut antara lain: asam aspartat, asam glutamate, serin, histidin, arginin, glisin, treonin, alanin, tirosin, triptofan, sistein, metionin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin, lisin, prolin.

Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan pada penelitian ini hanya teridentifikasi 15 asam amino sedangkan 3 asam amino yaitu triptofan, sistein dan prolin tidak teridentifikasi disebabkan karena triptofan akan mengalami kerusakan bila dilakukan hidrolisis asam amino dengan menggunakan asam (HCl). Sistein yang kaya akan elektron mudah mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya serangan dari radikal maupun non radikal pengoksida (Davies, 2005).

3. Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Angka Karbonil Protein IkanKakap (*Lutjanus sp*)

Protein karbonil merupakan salah satu „biomarker“ terjadinya oksidasi protein (Yan dkk, 1997) dan digunakan sebagai salah satu indikator terjadinya kerusakan/modifikasi protein yang disebabkan oleh radikal-radikal oksigen (Adamsdkk, 2001).



Gambar 16. Oksidasi angka karbonil protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) selama penyimpanan

Angka karbonil meningkat 4,3 kali pada suhu 0°C sedangkan pada suhu 10, 20, 30, dan 40°C angka karbonil meningkat masing-masing menjadi 4,8, 5,0, 7,2, dan 9,2 kali nmol/mg sampel. Peningkatan protein karbonil disebabkan pada protein kakap ikan dalam penelitian ini secara natural masih mengandung besi (Fe) sehingga dapat memicu kerusakan oksidasi.

Walaupun dengan asumsi kadar asam lemak dalam isolat protein sangat rendah sehingga dapat diabaikan, oksidasi lipida yang dikatalisa oleh Fe natural masih dapat terjadi. Perlakuan suhu 20-40°C (radiasi panas) meningkatkan kerusakan oksidasi tersebut. Hal ini terbukti pada hasil riset ini terutama pada suhu penyimpanan 30°C dan 40°C laju reaksi cenderung linier.

4. Kinetika Perubahan Angka Karbonil Protein Ikan Kakap (*Lutjanus sp*)

Nilai k meningkat dengan peningkatan suhu penyimpanan. K meningkat dari 0,0863 menjadi 1,4066 dengan peningkatan suhu dari 0 ke 40°C (Tabel 4.3). Konstanta laju (k) perubahan luas (y) menunjukkan nilai perubahan angka karbonil selama penyimpanan. Sedangkan R² menunjukkan tingkat kedekatan persamaan matematik dengan kondisi percobaan dalam menilai unit luas angka karbonil pada waktu tertentu.

Tabel 8. Persamaan linear sebagai fungsi waktu pada angka karbonil

| Suhu (°C) | Persamaan Linear | R ² | k |
|-----------|-------------------------|----------------|--------|
| 0 | $Y = -0.0863t + 4.2108$ | 0.987 | 0.0863 |
| 10 | $Y = -0.2043t + 4.4738$ | 0.981 | 0.2043 |
| 20 | $Y = -0.2978t + 5.5782$ | 0.894 | 0.2978 |
| 30 | $Y = -0.5939 + 4.4857$ | 0.935 | 0.594 |
| 40 | $Y = -1.4066 + 3.8169$ | 0.967 | 1.4066 |

Besarnya energi aktivasi pembentukan karbonil menurut reaksi orde nol adalah 52,02 KJ/mol.k. Sedangkan reaksi orde pertama adalah 43,37 KJ/mol.k. Prediksi angka karbonil protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) menurut reaksi orde nol dan reaksi orde pertama dapat dilihat pada Gambar 16. Kenaikan angka karbonil menunjukkan reaksi mengikuti orde ke nol. Hal ini disebabkan reaksi berjalan lambat pada suhu kamar dan tidak ada reaksi oksidasi yang disebabkan oleh fotooksidasi. Model kinetika perubahan kualitas protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) ditunjukkan pada persamaan 1 sampai 5 masing-masing suhu 0, 10, 20, 30 dan 40°C yakni:

$$Q_k(t) = 0.0863 e^{0.9782t} \dots\dots\dots(1)$$

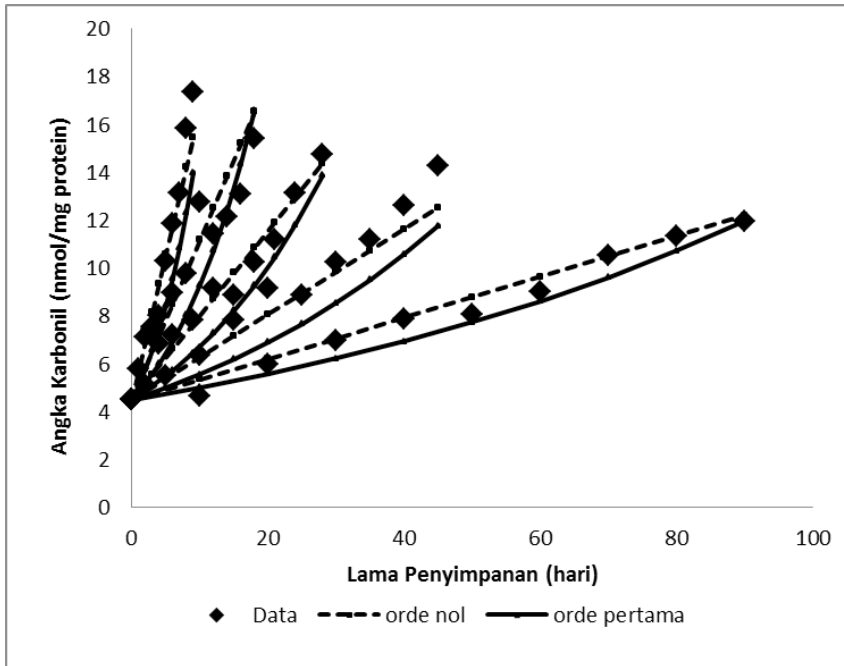
$$Q_k(t) = 0.2043 e^{0.8563t} \dots\dots\dots(2)$$

$$Q_k(t) = 0.2978 e^{1.0594t} \dots\dots\dots(3)$$

$$Q_k(t) = 0.594e^{1.526t} \dots\dots\dots(4)$$

$$Q_k(t) = 1.4066 e^{0.8358t} \dots\dots\dots(5)$$

Uji validasi ini menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada dataprediksi dan data empiris.



Gambar 17. Hubungan antara data (konsentrasi bahan), model reaksi orde nol, dan model reaksi orde pertama pada kadar karbonil protein ikan

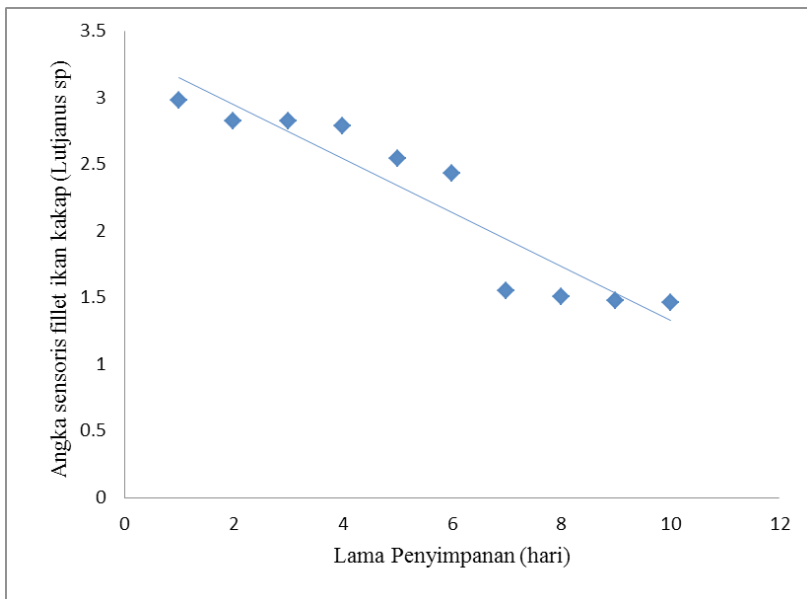
Menurut Kjarsgard dkk.,(2006); Baron dkk., (2007) dengan adanya kenaikan suhu dan lama penyimpanan menyebabkan protein karbonil meningkat. Sedangkan Adams dkk.,(2001) serangan radikal hidroksil yang dihasilkan dari degradasi H_2O_2 dengan kehadiran Fe^{2+} atau Cu^{2+} mengakibatkan terjadinya kerusakan protein yang ditandai dengan terbentuknya protein karbonil.

B. Evaluasi Sensoris *Fillet* Ikan Kakap (*Lutjanus sp*) dan Minyak Ikan Tuna (*Thunnus sp*) pada Suhu 40°C

Bahan yang dianalisa dengan uji sensoris adalah *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) dan minyak ikan tuna (*Thunnus sp*) yang disimpan pada suhu 40°C. Perlakuan penyimpanan pada suhu tersebut dipilih

karena *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) dan minyak ikan tuna (*Thunnus sp*) mudah mengalami oksidasi selama penyimpanan. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan tidak ada pengaruh perlakuan terhadap sensoris yang dinilai berdasarkan sifat bau, $F_{hitung} < F_{Tabel}$ (α 95%) (Lampiran 1).

Gambar 4.18. memperlihatkan rata-rata skor penilaian sampel terhadap *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) yang disimpan pada suhu 40°C menurun dengan meningkatnya umur simpan. Rata-rata nilai skor penilaian panelis pada jam ke-12 penyimpanan sudah menghasilkan skor 3 (agak suka dan tidak suka) sedangkan pada penyimpanan hari atau jam selanjutnya sampai hari ke-2,25 atau 54 jam skor menurun dari 2 (tidak suka) menjadi 1 (sangat tidak suka).



Gambar 18. Penilaian panelis terhadap sifat sensoris *Fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) selama penyimpanan.

Penurunan skor penilaian bau daging mulai penyimpanan jam ke-6 dan seterusnya menunjukkan telah terjadi kerusakan atau degradasi bahan. Secara umum keterangan yang diberikan oleh para panelis dengan semakin lama penyimpanan, bau sudah tidak tengik lagi akan tetapi menghasilkan bau busuk. Hal ini sesuai

dengan laporan Ghaly dkk, (2010) penyebab pembusukan pada ikan dapat terjadi akibat reaksi oksidasi.

Komoditas perikanan dikenal sebagai bahan yang mudah rusak sehingga mudah mengalami penurunan mutu. Daging ikan mempunyai komposisi kimia yang kompleks terdiri dari karbohidrat, protein, lemak, mineral dan lain-lain. Kerusakan oksidasi daging ikan dapat berasal dari lipida dan protein maupun non- oksidasi (Masniyom dkk, 2011). Pada kondisi fisik suhu 20-40°C proses oksidasi akan cepat terjadi dan menyebabkan kerusakan pada banyak bahan makanan. Laporan Makawa dkk, (2014) membuktikan panelis memberikan skor tidak suka (dislike) pada ikan Pond raised tilapia yang disimpan pada suhu kamar setelah penyimpanan 7 jam dan setelah 12 jam ikan tidak dapat diterima (rejected samples).

Di samping itu proses pembusukan ikan telah terjadi 12 jam setelah penangkapan pada suhu ruang di daerah tropis (Berkel dkk, 2004). Secara umum suhu ruang di Yogyakarta selama bulan Februari 2015 berkisar antara 28-31°C. Dengan demikian daging ikan yang disimpan diatas suhu ruang (40°C) menyebabkan daging lebih mudah rusak, baik akibat aktivitas enzim dalam tubuh ikan sendiri, atau oksidasi lipida dan protein pada ikan oleh radikal bebas maupun yang dikatalisa oleh logam dan cahaya.

Hal berbeda pada penyimpanan minyak tuna pada suhu 40°C, sebab komposisi kimia minyak tuna tidak sekompleks daging ikan kakap dan hanya mengandung fraksi lipida. Ketahanan minyak tuna selama penyimpanan pada suhu 40°C dibandingkan dengan daging kakap mungkin terkait dengan kandungan EPA dan DHA. Laporan Dahl dan Malcata, (1999) menyebutkan bahwa minyak ikan sarden relatif lebih stabil terhadap oksidasi pada suhu 50-70°C selama 10 jam dan secara kualitatif menghasilkan senyawa volatil pada suhu 80°C. Hal ini menjelaskan bau terjadi setelah minyak sarden disimpan pada suhu 80°C.

Lebih lanjut Dahl dan Malcata, (1999) menjelaskan karena minyak sarden mengandung ikatan rangkap lebih dari 4. Dilihat

dari profil gizi antara ikan tuna dan sardine hanya sedikit berbeda walaupun sangat berbeda kandungan vitamin dan mineralnya. Dengan demikian berdasarkan kandungan EPA dan DHA antara minyak tuna dan daging kakap, maka minyak tuna lebih tahan terhadap oksidasi dibanding daging kakap selama penyimpanan pada suhu 40°C.

Produk oksidasi protein merupakan senyawa volatil (Eyo, 2001) diantaranya berasal dari golongan karbonil yang memberi kontribusi pada bau yang tidak disukai (off-flavour) diantaranya bau tengik (Masniyom dkk, 2011; Honkakutia dkk, 2005). Hal ini sesuai dengan laporan Yongsawatdigul dkk, (2000), terjadi degradasi protein pada surimi tilapia tropis ketika disimpan pada suhu 40°C dengan aktivitas maksimum pada 65°C.

Secara umum senyawa volatile karena substansi MDA yang terdeteksi bersifat volatil. Menurut Kilcast dan Subramanian (2000) bau tengik dapat diukur berdasarkan senyawa hasil oksidasi lipida yang terbentuk. Dengan demikian sifat sensoris penting pada bahan pangan yang disimpan apakah telah mengalami oksidasi lipida dengan terbentuknya substansi MDA. Berdasarkan analisis regresi (Lampiran. II) hubungan antara angka TBA dengan sifat sensoris minyak ikan tuna (*Thunnus sp*) memperlihatkan nilai korelasi 0,871; sedangkan pada daging kakap 0,787. Menurut Sarwono (2006) korelasi yang menunjukkan nilai 0,75-0,99 berarti korelasi sangat kuat.

Intepretasi nilai koefisien determinasi mempunyai interval mulai dari 0 sampai 1 ($0 \leq R^2 \leq 1$). Semakin besar koefisien (mendekati 1), maka semakin baik variabel independent secara keseluruhan menjelaskan variabilitas dari variabel dependent (Sulaiman, 2004). Dengan demikian varian sensoris total pada minyak tuna yang dapat diterangkan oleh angka TBA (MDA ekuivalen) sebesar 78,7% sedangkan pada daging kakap 61,9%. Dengan kata lain variabilitas total yang dapat diterangkan garis regresi di sekitar rata-ratanya adalah R^2 , sedangkan sisanya 21,3% pada minyak tuna dan 38,1% pada daging kakap diterangkan oleh variabel lain.

BAB VI

PENUTUP

Berdasarkan hasil analisis data, orde reaksi yang berlangsung pada *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) adalah orde reaksi nol dimana, selama penyimpanan 0 hari sampai 45 hari grafik penyimpanan cenderung linier. Demikian pula pada protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) yang disimpan selama 0 hari sampai 90 hari orde reaksi yang berlangsung adalah orde reaksi nol. Penelitian tahap I menunjukkan nilai k meningkat dari 0,0863 menjadi 1,4066 dengan peningkatan suhu dari 0 ke 40°C. Energi aktivasi (E_a) yang dibutuhkan dalam reaksi oksidasi protein ikan pada reaksi orde nol selama penyimpanan adalah 42,015 KJ/mol.K. Sedangkan energi aktivasi (E_a) untuk orde pertama adalah 34,818 kJ/mol.k yang memperlihatkan laju pembentukan kadar karbonil lambat atau reaksi orde ke nol.

Penelitian tahap II nilai k meningkat kecepatan terbentuknya peroksidameningkat 9,6 kali pada suhu 0°C dengan peningkatan suhu penyimpanan, sedangkan pada suhu 10, 20, 30, dan 40°C angka peroksida meningkat masing- masing menjadi 14,33, 16,12, 19,19, dan 23,05 kali meq/kg sampel. Besarnya energi aktivasi (E_a) pembentukan peroksida menurut reaksi orde pertama adalah 59,68 KJ/mol.K, energi aktivasi (E_a) menurut orde nol adalah 71,94 KJ/mol.K. Kecepatan terbentuknya angka asam meningkat 2,35 kali pada suhu 0°C dengan adanya peningkatan suhu penyimpanan, pada suhu 10, 20, 30, dan 40°C angka asam meningkat masing-masing menjadi 2,44, 2,97, 3,51, dan 5,28 kali mg KOH/g sampel.

Angka karbonil meningkat 5,22 kali pada suhu 0°C, pada suhu 10, 20, 30, dan 40°C angka karbonil meningkat masing-masing menjadi 6,35, 6,66, 7,05, dan 8,94 kalinmo/gr. Besarnya energi aktivasi pembentukan karbonil menurut reaksi orde nol adalah

57,76 KJ/mol.k, energi aktivasi (E_a) reaksi orde pertama adalah 62,05 KJ/mol.k.

Rata-rata nilai skor penilaian panelis terhadap semua perlakuan penyimpanan daging ikan kakap (*Lutjanus sp*) mulai penyimpanan jam ke-12 dan seterusnya menunjukkan telah terjadi kerusakan atau degradasi bahan. Secara umum keterangan yang diberikan oleh para panelis dengan semakin lama penyimpanan, bau sudah tidak tengik lagi akan tetapi menghasilkan bau busuk.

Penelitian - penelitian tentang terjadinya oksidasi protein dan lemak dalam bahan pangan belum banyak mendapat perhatian, terutama oksidasi protein padahal konsekuensi dari terjadinya oksidasi akan memberikan efek signifikan terhadap sifat fisik, kimia, nutrisi dan sifat fungsional protein dan lemak pangan. Penelitian yang dilakukan ini merupakan langkah awal dari mengkaji terjadinya oksidasi protein dan lemak terutama pada daging ikan. Kajian juga perlu dilakukan terutama efek fisik dari bahan pangan melalui proses uji sensoris pada berbagai suhu dan lama penyimpanan. Demikian juga dengan penggunaan model kinetika *arrhenius* untuk membantu pengambilan keputusan dalam melakukan kajian ilmiah.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, S., Green, P., Claxton, R., Simcox., Williams, M. V., Walsh, K., (2001). Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in Bioscience*, 6: 17-24
- Adnan, M. (1980). Lipid Properties and Stability of Partially Defatted Peanuts. Doctor Thesis, Department of Food Science, *University of Illinois, Urbana-Champaign*.
- AOAC., 2006, "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry", *Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC*.
- Aranda, M., Mendoza, N., & Villegas, R. (2005). Lipid damage during frozen storage of whole jack mackerel (*Trachurus symmetricus murphyi*) *Journal of Food Lipids*, 13, 155–166.
- Aubourg.S.P, Piñeiro.C, González.M.J. 2004. Quality Loss Related to Rancidity Development During Frozen Storage of Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*). *Instituto de Investigaciones Marinas Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 36208-Vigo, Spain
- Baron, P.C., Kjaesgrad, I.V.H., Jessen, F., Jacobsen, C., (2007). Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8118-8125.
- Berkel, M, B., Van den Boogard, B., dan Heijnen, C., 2004, "Preservation of fish and Meat", *Agromisa Foundation, Wageningen, the Netherlands*.
- Berlett.B.S, Stadman.E.R, 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress *Journal Biological Chemistry*. Vol. 272 (33): 20319-20316.
- Bimbenet, J.J., Schubert, H., Trystram, G., 2007. Advances in research in food process engineering as presented at ICEF9. *Journal of Food Engineering* 78, 390–404.
- Chayasit, W., Elias, R, J., McClements, D, J., dan Decker, D, A., 2007, "Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*., 47, 299–317.

- Davies.M.J.,Fu.S.,Dean.R.T.1995. Protein Hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Journal Biochemical*. 305: 643-649.
- Davies.M.J, Hawkins.C.L, Wright.A. 2000. *Singlet oxygen induced protein oxidation*.
- Davies,M.J., 2003.Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.*Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 305: 761-770.
- Davies.M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochemica et Biophysica Acta*.Vol.1703. p. 93-109.
- Garrison.W.M. 1987. Reaction mechanism in radiolysis of peptides, polypeptides and protein. *Chemical Review*. 97:381-398.
- Ghaly.A.E, Dave.D, Budge .S, Brooks.M.S. 2010. Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review Department of Process Engineering and Applied Science, *Dalhousie University Halifax*, Nova Scotia, Canada.
- Gooch, J.A., Hale, M.B., Brown, T.Jr., Bonnet, J.C., Brand, C.G., Regier, L.W., (2013). Proximate and fatty acid composition of 40 southeastern U.S. finfish species.U.S. *Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration National Marine Fisheries Service*.
- Jena .S.D, Behera. M, Dandapat .J, Mohanty.N. 2008. Non-enzymatic antioxidant status and modulation of lipid peroxidation in the muscles of *Labeo rohita* by sub lethal exposure of CuSO₄. *Department of Biotechnology*, North Orissa University, Takatpur, Baripada-757003 Orissa, India.
- Kilcast, D., dan Subramanian, P., 2000, "*The stability and shelf-life of food*", Woodhead Publishing Series In Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, UK.
- Konusu, S., Yamaguchi, K., (2013). The flavor components in fish and shellfish. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Product. *The AVI Publishing Company. Inc. Westport*. Connecticut.
- Lappin, G.R., and Clark, L.C.,(1951). Colorimetric methods for determination of trace carbonyl compound. *Analytical Chemistry*, 23:541-542.
- Makawa, Z., Kapute, F., dan Valeta, J., 2014, " Effect of delayed processing on nutrient composition, pH and organoleptic quality of pond raised

- Tilapia (*Oreochromis shiranus*) stored at ambient temperature", *Ajfund.*, 14(3), 8872-8884.
- Maqsood, S., & Benjakul, S. (2011). Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*, 124: 875–883.
- Masniyom, P., 2011, "Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging", *Songklanakarin Journal Science Technology*, 33: 181-192.
- Medina.I, González.M.J,Iglesias.J, Hedges.D.N. 2009. Effect of hydroxycinnamic acids on lipid oxidation and protein changes as well as water holding capacity in frozen minced horse mackerel white muscle. *Food Chemistry*. 114:881–888.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Vincent, A., & Renerre, M. (2001). Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Science*, 58: 125–134.
- Min. D. B., Boff. J.M. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Food. Comprehensive. *Reviews in Food Science & Food Quality*. Vol I.
- Nurnadia, A.A., Azrina, A. and Amin, I. (2011). Proximate composition and energetic value of selected marine fish and shellfish from the West coast of Peninsular Malaysia. *International Food Research Journal*, 18: 137-148.
- Okada, M. (2010). Fish and raw material. In science of processing marine food product. Vol. I. editor. T. Motohiro, H. Kadota. K. Hashimoto. M. Katayama and T. Tokunaga. *Japan International Cooperation Agency. Hyoga International Centre Japan*.
- Oxford Biomedical Research, 2012, "Fluorometric Microplate Assay for 2- Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)", Oxford Biomedical Research Inc., 1-5.
- Pazos, M., Medina, I., & Hultin, H. O. (2005). Effect of pH on hemoglobin- catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 3605–3612.
- Perrot, N., Ioannou, I., Allais, I., Curt, C., Hossenlopp, J., Trystram, G., 2006. Fuzzy concepts applied to food product quality control: a review. *Fuzzy Sets and Systems* 157: 1145–1154.

- Renner, M. (2000). *Oxidative processes and myoglobin*. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (pp. 113–134). OECD, New York: John Wiley & Sons.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 555–564.
- Richards, M. P., Østdal, H., & Andersen, H. J. (2002). Deoxyhemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 1278–1283.
- Sablani, S., Datta, A.K., Rahman, M.S., Mujumdar, A.S., 2007. *Handbook of Food and Bioprocess Modelling Techniques*. CRC Press, Boca Raton Fla.
- Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32: 307–326.
- Shaviklo, G.R., (2006). Quality assessment of ash protein isolates using surim standard methods. *Reykjavik, Ice/and: The United Nations University*.
- Simpson, J.A., Narita, S., Giese, S., Gebicki, S., Dean, R.T., 1992. Long-lived reactive species on free radicals damaged protein. *Biochemical Journal*, 282:621–624.
- Soyer, A., Hultin, H. O., (2000), Kinetics of oxidation of the lipids and proteins of cod sarcoplasmic reticulum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2127–2134.
- Stadman, E.R., Levine, R.L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218.
- Tien, M., Berlet, B.S., Livine, R.L., Chock, P.B., Stadman, E.R. 1999. Peroxynitrite-mediated modification of protein physiological carbon dioxide concentrations: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7809–7814.
- Tokur, B., Korkmaz, K., (2007). The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chemistry*, 104:754–760.
- Trevisan, M., Browne, M., Ram, P. M., Freudenheim, J., Carosella, A., N., dan Armstrong, D., 2001, "Correlates of markers of oxidative

- status in the general population", *Am. J. Epidemiol.*, 154, 348–356.
- Trystram, G. 2012. Modelling of food and food processes. *Journal of Food Engineering*, 110: 269–277.
- Undeland, I., Kristinsson, H. G., & Hultin, H. O. (2004). Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: effect of pH and hemoglobin source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4444–4451.
- Vareltzis, P., Hultin, H. O., Autio, W. R., (2008). Hemoglobin-mediated lipid oxidation of protein isolates obtained from cod and haddock white muscle as affected by citric acid, calcium chloride and PH. *Food Chemistry*, 108: 64–74.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, G. H., Thorkelsson, G., Jacobsen, C., Hamaguchi, Y. P., Ólafsdóttir, G., (2010). Inhibition of haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod muscle and cod protein isolates by *Fucus vesiculosus* extract and fractions. *Food Chemistry*, 123: 321–330.
- WFLO, 2012, "Rancidity and Antioxidants", World Food Logistics Organization Commodity Storage manual.
- Whang, K. dan Peng, I. C., 1988. Electron Paramagnetic Resonance Studies of Effectiveness of Myoglobin and its Derivatives as a Photosensitizer in Singlet Oxygen Generation. *Journal Food Science*. 53: 1863–1865.
- Yan, L. J., Levine RL, Sohal, R. S., (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11168–11172

LAMPIRAN 1. PROSEDUR ANALISIS PENELITIAN

1. Analisis Proksimat (AOAC, 2006)

Penentuan protein

Ditimbang 0,041g sampel yang telah ditumbuk halus, dimasukkan ke dalam labu Kjeldhal, ditambahkan 10 g Na_2SO_4 anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Campuran tersebut dipanaskan dengan pemanas listrik/api Bunsen dalam lemari asam, mula-mula dengan api kecil dan setelah asap hilang api diperbesar. Pemanasan diakhiri setelah cairan jernih dan tidak berwarna. Dibuat pila blanko yaitu seperti prosedur diatas tetapi tanpa sampel. Setelah larutan dingin ditambahkan 200 ml aquades dan 1g Zn, serta larutan NaOH 45% sampai bersifat basis. Labu Kjeldhal dipasang pada alat destilasi. Labu Kjeldhal dipanaskan sampai ammonia menguap semua. Destilat di tampung dalam Erlenmeyer 100 ml yang sudah diisi dengan HCl 0,1 N dan indikator phenophthalein 1% beberapa tetes. Destilat diakhiri setelah volume destilat yang terampung tidak bersifat basis. Kelebihan HCl dalam Erlenmeyer dititrasi dengan larutan basa standar (NaOH 0,1N)

Perhitungan :

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH sampel})}{\text{gr sampel} \times 10} \times \text{N NaOH} \times 14,008$$

$$\% \text{ protein} = \% \text{ N} \times 6,25$$

Penentuan minyak kasar (metode soxhlet)

Ditimbang 1,48 g bahan kemudian dihancurkan dalam penumbuk dengan campuran chloroform-methanol (2:1) sebanyak 10 ml selama beberapa menit. Homogenat yang diperoleh didiamkan beberapa menit, kemudian disaring ke dalam Erlenmeyer 50 ml tertutup lewat kertas saring bebas lemak. Filtrat dicuci dengan menambahkan aquades sebanyak 1 ml volume filtrate, digojog dan didiamkan sampai dua bagian cairan terpisah. Cairan bagian atas boleh sedikit tertinggal dan untuk menjadikan larutan homogen kembali, ditambahkan sedikit methanol dan chloroform-methanol

secukupnya. Larutan yang diperoleh dikeringkan dalam oven dan ditimbang.

Perhitungan :

$$\% \text{ Lemak} = \frac{\text{Berat botol setelah di oven (g)} - \text{Berat botol kosong (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

Penentuan kadar air (metode pemanasan)

Ditimbang 1,08 gr sampel berupa bubuk (yang telah dihaluskan) diletakkan dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya. Botol dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam, didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Dipanaskan kembali botol dalam oven; perlakuan di ulang sampai terdapat berat konstan. Selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg. Pengurangan berat merupakan banyak air dalam bahan.

Perhitungan :

$$\text{Kadar air (\%bk)} = \frac{(B-C)}{(B-C)} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat botol kosong

B = Berat botol kosong + sampel

C = Berat botol kosong + sampel setelah dioven

Penentuan kadar abu (metode grafitasi)

Dimasukkan 2 g sampel ditimbang dalam krus porselen yang kering dan telah diketahui beratnya, dipijarkan pada muffle dalam tanur pada suhu 500°C selama 4 jam sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan dan beratnya konstan dengan selang pengabuan 30 menit.

Perhitungan :

$$\text{Kadar abu (\%bb)} = \frac{\{(\text{Berat cawan} + \text{sampel setelah dioven}) - (\text{berat cawan})\}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

(berat cawan + sampel)

Kadar karbohidrat

Pengamatan kadar karbohidrat dilakukan dengan metode By difference dengan perhitungan sebagai berikut :

Kadar karbohidrat (%) = 100 % -% (kadar air + kadar abu + kadar lemak + kadar protein)

2. Analisis Protein Karbonil (Lappin dan Clark, 1951)

a. Penentuan Kadar Karbonil

Ditimbang 0,5-1,5 g daging ikan, diencerkan menjadi 25 ml (dengan aquades), diambil 1 ml diencerkan lagi menjadi 10 ml (FP = 250x), diambil 2,5 ml diencerkan lagi menjadi 10 ml (FP = 1000x). 1 ml larutan hasil pengenceran terakhir dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 1 ml 2,4 dinitrofenilhidrasil. Tambahkan KOH 1N sebanyak 7,5 ml lalu divortex shaker. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 480nm. Konsentrasi karbonil sampel dihitung berdasarkan kurva standar yang diperoleh dari aseton murni.

b. Pembuatan kurva standar karbonil

Sebanyak 1 ml aseton murni diencerkan menjadi 100ml, diambil 10 ml dan diencerkan lagi menjadi 100 ml sehingga total pengencerannya adalah 1000x (1000ppm). Larutan terakhir diambil sebanyak 1 ml diencerkan menjadi 10 ml (10 ppm), diencerkan lagi 1:1 (50 ppm) yang kemudian dijadikan larutan A.

Larutan standar dibuat sebagai berikut:

- a. 0,0 ml larutan A + 1,0 ml aquadest = 0 ppm.
- b. 0,1 ml larutan A + 0,9 ml aquadest = 5 ppm.
- c. 0,2 ml larutan A + 0,8 ml aquadest = 10 ppm.
- d. 0,3 ml larutan A + 0,7 ml aquadest = 15 ppm.
- e. 0,4 ml larutan A + 0,6 ml aquadest = 20 ppm.
- f. 0,5 ml larutan A + 0,5 ml aquadest = 25 ppm.

- g. 0,6 ml larutan A + 0,4 ml aquadest = 30 ppm.
- h. 0,7 ml larutan A + 0,3 ml aquadest = 35 ppm.
- i. 0,8 ml larutan A + 0,2 ml aquadest = 40 ppm.
- j. 0,9 ml larutan A + 0,1 ml aquadest = 45 ppm.
- k. 1,0 ml larutan A + 0,0 ml aquadest = 50 ppm.

Masing-masing larutan standar dalam tabung reaksi di tambahkan 2,4 dinitrophenihidrazin dan 1 tetes HCl pekat. Dipanaskan selama 30 menit pada suhu 50°C kemudian didinginkan. Tambahkan lagi KOH 1 N sebanyak 8 ml dan di vortex shaker. Diukur panjang gelombang pada 480 nm. Kurva standar dibuat dengan persamaan $Y = ax + b$, dimana Y = absorbansi; X = kadar karbonil (ppm).

$$\% \text{ kadar karbonil} = \frac{X \times FP}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

3. Analisis Asam Amino (modifikasi Populin dkk., 2007)

Sampel ekstrak daging ikan 0,06 g dimasukkan kedalam 4 ml 6 N HCl dan diblender selama 2 menit.

Dilakukan penetralan dengan 1 N NaOH sampai pH 7.

Sentrifugasi larutan pada 20000g selama 20 menit pada suhu 4°C dan disaring.

Dari filtrate diambil 50 mikro liter dan dicampur dengan 250 mikro liter OPA, diaduk selama 1 menit.

Diambil 20 mikro liter dari campuran dan diinjeksi ke HPLC.

Spesifikasi HPLC : Tipe Shimadzu LC 10

Kolom Licrospher 100RP 18 (5µm)

Panjang kolom 125 ml x 4mm

Fase mobil: A = CH₃OH: 50mM Na-asetat: THF (2:96:2) pH 6,8

B = 65% CH₃OH

Flow rate: 1 ml/mnt

| | | |
|---------------------|---------------------------|-----------|
| Detector | Flourecen Shimadzu RF-138 | |
| | EX Wavelength : 360 | |
| | EM Wavelength : 460 | |
| Gradien eluen: time | pump (A%) | pump (B%) |
| 0,1 | 100 | 0 |
| 45 | 0 | 100 |
| 50 stop | | |

Perhitungan: dibuat larutan standar asam amino dengan konsentrasi (ppm) yang berbeda dan ditambah 500 μ L larutan OPA, di diamkan selama 5 menit, diambil 20 μ L dan di injeksikan pada HPLC. Hubungan antara konsentrasi standar dan luas area akan dihasilkan suatu persamaan regesi ($Y = aX + b$). Data luas area sampel masing-masing asam amino 'umami' diproses ke dalam persamaan regesi dan disesuaikan dengan jumlah sampel yang dianalisis.

Contoh perhitungan asam glutamat

Persamaan regesi asam glutamat $Y = 402,46X + 936,05$

Luas area sampel perlakuan ekstraksi pada pH 5 selama 6 menit: 56105

Berat sampel perlakuan ekstraksi pada pH 5 selama 6 menit: 1,0566g

Volume ekstrak perlakuan ekstraksi pada pH 5 selama 6 menit: 41 ml

Konsentrasi sampel/luas area: $[(56105-936,05)/402,46 \text{ ppm} = 137.08 \text{ ppm}$ (1 ppm = 1 mg/1000 ml)

Kadar bahan (mg/g): $[(137.08 \text{ ppm} \times 41 \text{ ml})/1000]/1,0566\text{g} = 5,32 \text{ mg/g}$

Kadar bahan (%): 0,53%

4. Analisis senyawa mineral (Fe)

Metode digesti kering (Khan dkk., 2009)

1 gram sampel dengan ukuran 1 mm mesh digesti dengan HNO_3 dan didinginkan. Sampel dilarutkan dengan 2x air distilat

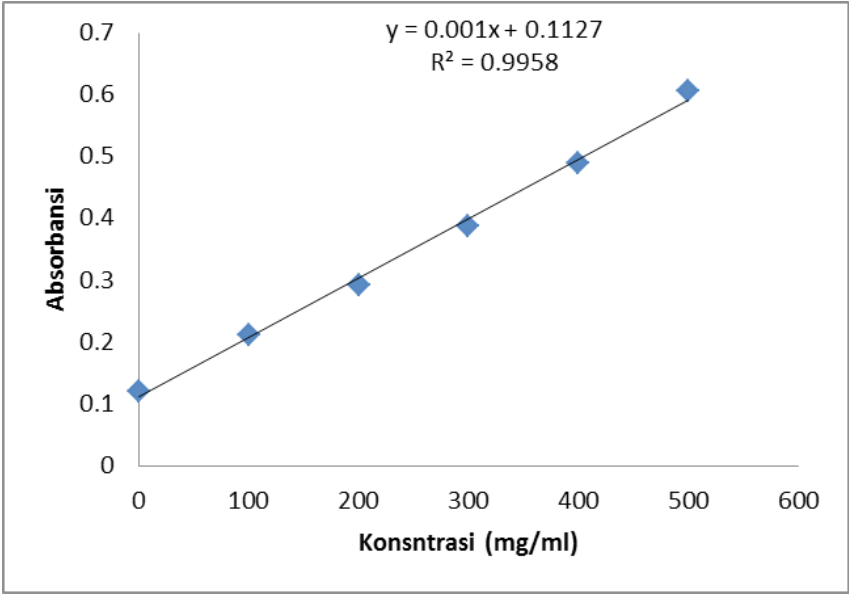
sampai volume 50 ml. Sampel kembali di digesti kering dengan HNO_3 pekat : HClO_4 (8mL : 0,6mL), setelah digesti, volume dibuat menjadi 25 ml dengan 2x air distilat. Larutan siap untuk pengukuran dengan AAS.

LAMPIRAN II. HASIL PENGAMATAN DAN ANALISIS DATA

1. Pembuatan kurva standar karbonil

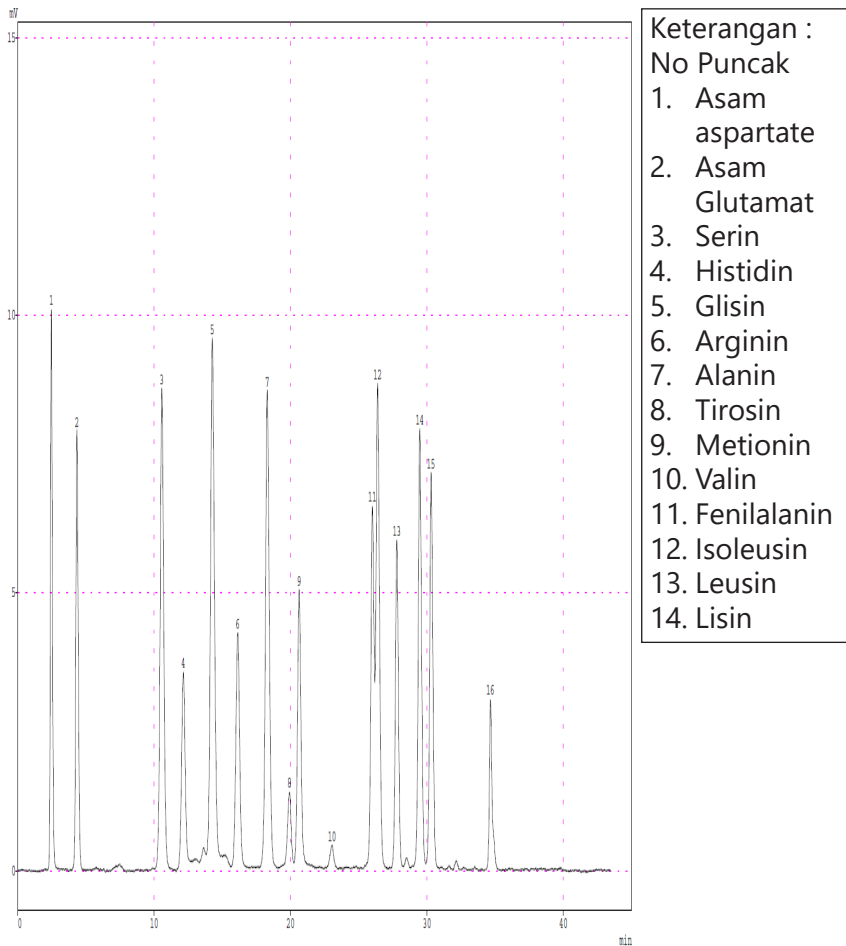
Tabel 1. Konsentrasi dan absorbansi karbonil

| | Absorbansi | Konsentrasi |
|-------|------------|-------------|
| S 0.0 | 0.191 | 0.00 |
| S 0.1 | 0.246 | 0.005 |
| S 0.2 | 0.298 | 0.01 |
| S 0.3 | 0.348 | 0.015 |
| S 0.4 | 0.398 | 0.02 |
| S 0.5 | 0.438 | 0.025 |



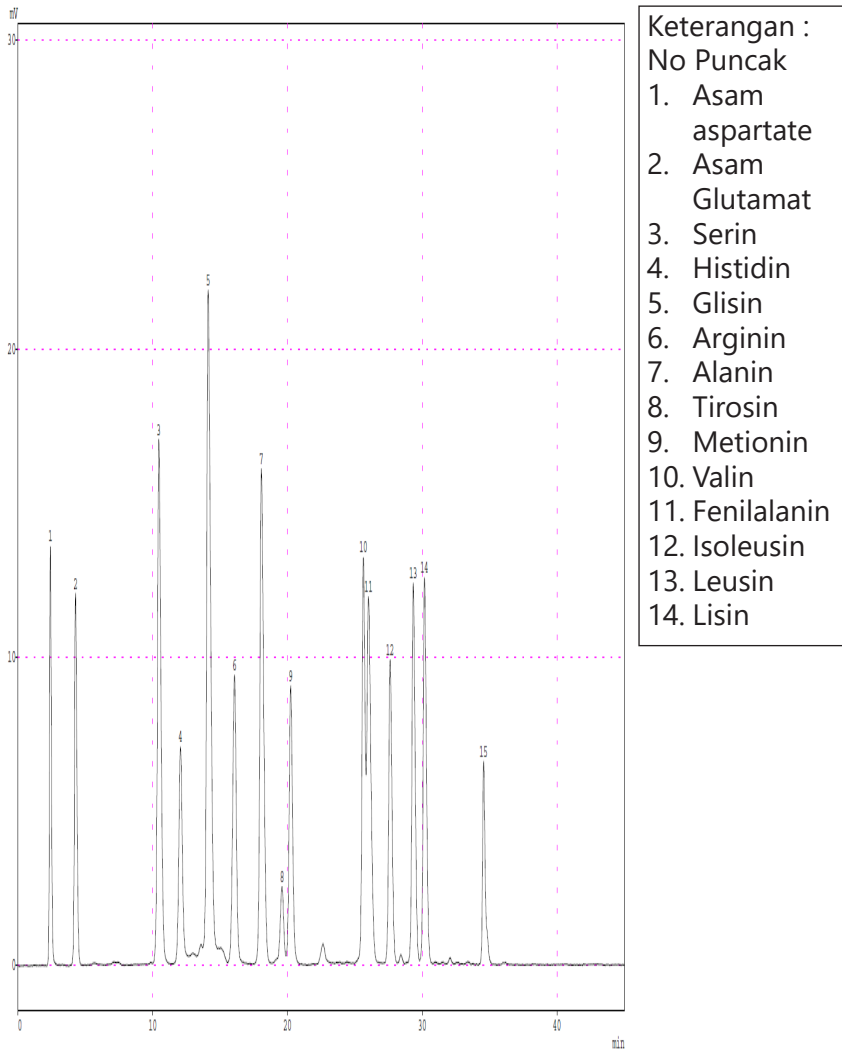
Gambar 1. Kurva standar karbonil

2. Kromatogram standar 16 asam amino dengan menggunakan HPLC (100ppm)



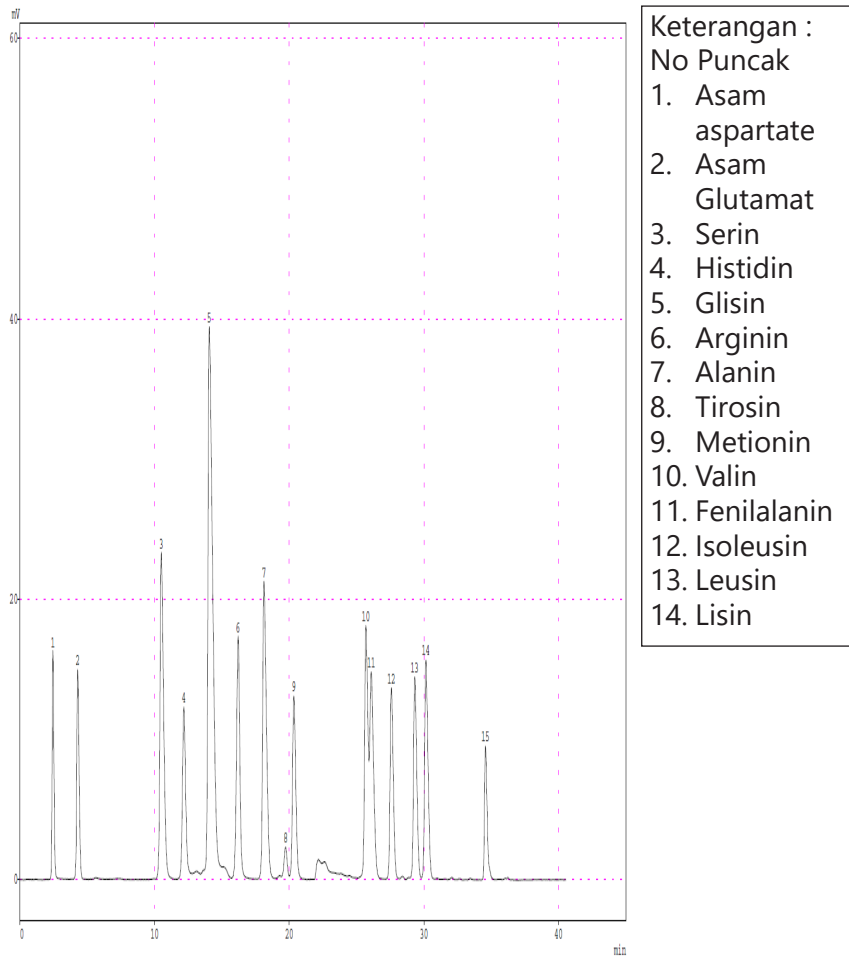
Gambar 2. Kromatogram standar asam amino (100ppm)

3. Kromatogram standar 16 asam amino dengan menggunakan HPLC (250ppm)



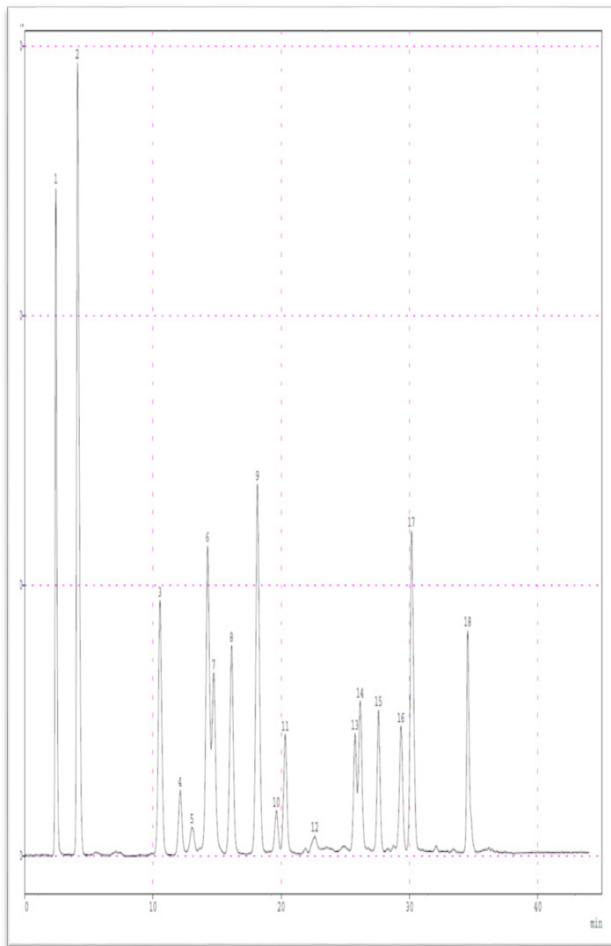
Gambar 3. Kromatogram standar asam amino (250ppm)

4. Kromatogram standar 16 asam amino dengan menggunakan HPLC (350ppm)



Gambar 4. Kromatogram standar asam amino (350ppm)

5. Kromatogram asam amino dari *fillet* ikan kakap (*Lutjanus sp*) menggunakan HPLC



Keterangan :

No Puncak

1. Asam
aspartate

2. Asam
Glutamat

3. Serin

4. Histidin

5. Glisin

6. Arginin

7. Alanin

8. Tirosin

9. Metionin

10. Valin

11. Fenilalanin

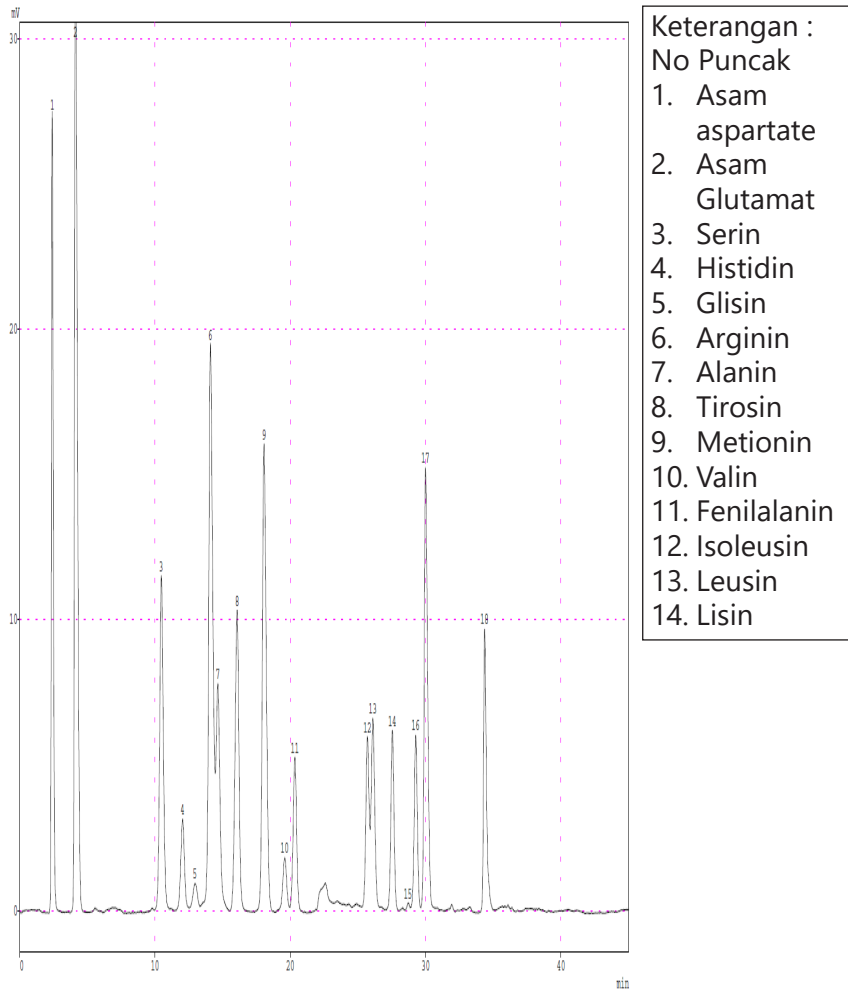
12. Isoleusin

13. Leusin

14. Lisin

Gambar 5. Kromatogram profil asam amino

6. Kromatogram asam amino dari protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) dengan menggunakan HPLC



Gambar 6. Kromatogram asam amino protein ikan kakap

TENTANG PENULIS

Dr. Rahim Husain, S.Pi.,M.Si dilahirkan di Gorontalo 16 Mei 1971. Setelah menyelesaikan pendidikan S1 Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado Tahun 1994, Melanjutkan Magister Sains di bidang Industri Teknologi Hasil Perikanan Pasacasarjana Universitas Sam Ratulangi Manado.

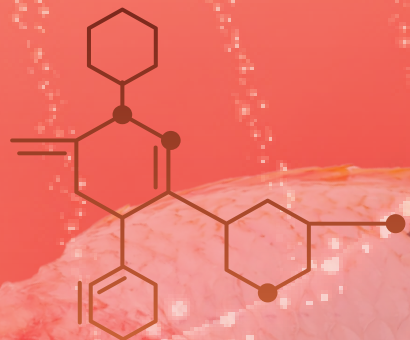
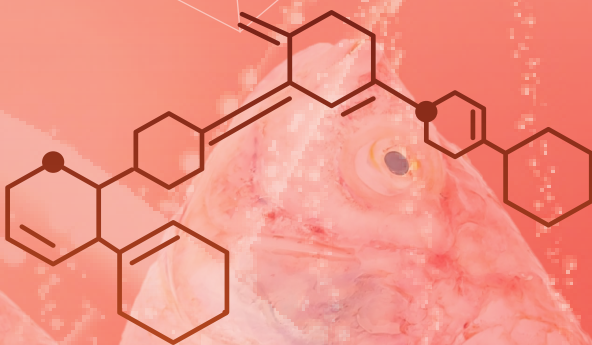
Selanjutnya, Penulis menjadi Staf Pengajar di Universitas Negeri Gorontalo Tahun 2004. Pada Tahun 2005 menjabat sebagai Kepala Laboratoriun Jurusan Teknologi Perikanan Fakultas Ilmu-Ilmu Pertanian Universitas Negeri Gorontalo dan Tahun 2006 menjabat Ketua Program Studi Teknologi Hasil Perikanan.

Pada Tahun 2009, Melanjutkan Studi di bidang Ilmu Pangan Di Fakultas Teknologi Pertanian Konsentrasi *Fish Processing* Universitas Gadjadara Yogyakarta. Sekarang ini, Penulis mengajar di Program Strata satu (S1) dan Strata dua (S2) Ilmu kelautan Universitas Negeri Gorontalo.

Oksidasi protein adalah terjadinya modifikasi ikatan kovalen pada protein yang diinduksi baik secara langsung oleh senyawa-senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) maupun secara tidak langsung oleh produk-produk sekunder dari keadaan stress oksidatif.

Protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi (antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksil, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya), molekul-molekul pengoksidasi non radikal (oksigen singlet, HOCl, HOBr, peroksinitrit, O_3 dan sinar ultra violet), dan oleh reaksi-reaksi sekunder dari produk-produk intermediate oksidasi protein yang reaktif serta oleh produk oksidasi protein itu sendiri.

Selain oleh senyawa oksigen reaktif, kerusakan oksidatif protein dapat juga disebabkan oleh interaksi dengan produk-produk hasil oksidasi lipid seperti 4-hidroksinonenal dan malonaldehida.



✉ zahirpublishing@gmail.com
🌐 www.zahirpublishing.net

ISBN 978-623-466-179-8



9 786234 661798