

PERAN ENZIM PROTEASE ENDOGENUS DALAM PROSES PELUNAKAN DAGING SELAMA *POST MORTEM*

Sri Raharjo

Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Proteolysis of myofibrillar proteins is responsible for structural degradation in skeletal muscle leading to meat tenderization. Among endogenous proteases involved in post mortem proteolysis, only calpains (calcium-dependent proteolytic systems) have been proven of having a predominant role in post mortem tenderization. Calpains consist of μ -calpain (proteinase requiring 5-70 μ M Ca^{2+} for activity), m-calpain (proteinase requiring 100 - 2000 μ M Ca^{2+} for activity), calpastatin (a specific inhibitor to calpains and it also requires Ca^{2+} to bind to the proteinases). Although calpastatin is a well known inhibitor for calpains activity, present knowledge on the regulation of calpain activity is by no means complete. However, there is no doubt that there are factors other than proteolysis such as elevated ionic strength and presence of connective tissues that will certainly affect meat tenderness.

protein miofibril terdegradasi oleh enzim proteolitik endogenous, namun jaringan pengikat yang komponen utamanya adalah kolagen ternyata tidak mengalami perubahan selama penyimpanan dingin. Konsentrasi dan sebaran kolagen serta adanya ikatan silang intermolekuler dalam kolagen ini berperan langsung terhadap tingkat kekerasan daging. Mengingat jaringan pengikat tersebut tidak terdegradasi selama pelayuan dan menentukan tekstur daging maka hal ini dianggap sebagai *background toughness*.

Mengingat kelunakan daging merupakan salah satu karakteristik indrawi yang penting maka sangatlah dipandang perlu untuk memahami proses pelunakan selama *post mortem* agar selanjutnya bisa digunakan sebagai dasar untuk pengembangan cara pengendaliannya. Pengembangan metode pelunakan daging dengan mengendalikan aktivitas enzim proteolitik endogenous bisa memberikan dampak positif bagi industri hasil ternak khususnya daging sapi. Diharapkan dengan cara ini, lama waktu pelayuan karkas untuk menghasilkan daging yang lunak bisa dipersingkat. Paper ini dimaksudkan untuk membahas dan merangkum hasil-hasil penelitian tentang proses pelunakan daging selama pelayuan (*post mortem*) yang telah dipublikasikan. Oleh karena itu pengaruh umur, jenis sapi dan pakan terhadap tingkat kelunakan daging tidak akan dibahas dalam paper ini.

PENDAHULUAN

Salah satu parameter yang sangat penting dalam menentukan kualitas daging adalah kelunakan (*tenderness*). Sejak saat sapi disembelih hingga disimpan dalam ruangan pelayuan, daging mengalami perubahan tingkat kelunakan. Sesaat setelah penyembelihan hingga 20 - 30 menit berikutnya, terjadi kontraksi otot secara tidak terkendali dan selang waktu ini disebut tahap *pre-rigor*. Tahap ini berlangsung selama sistem syaraf yang mengatur kontraksi masih bisa berfungsi. Tahap berikutnya adalah fase *rigor* yang mulai berlangsung 4 - 8 jam setelah penyembelihan. Fase ini ditandai dengan habisnya persediaan senyawa berenergi tinggi (ATP & kreatin fosfat), penurunan pH dari 7,0 menjadi 5,4 - 5,7 dan tekstur daging menjadi lebih keras. Karkas yang sudah mengalami *rigor* apabila disimpan lebih lanjut pada suhu 4°C maka teksturnya akan berubah menjadi lebih lunak sebagai akibat aktivitas enzim proteolitik endogenous terhadap protein miofibril. Meskipun

SISTEM PROTEOLITIK DALAM PROSES PELUNAKAN DAGING

Selama pelayuan karkas pada suhu 2 - 4°C terjadi banyak perubahan pada otot rangka yang mengakibatkan rusaknya integritas struktur jaringan otot tersebut. Kerusakan integritas struktur otot rangka ini berhubungan

langsung dengan proses pelunakan daging. Dari Tabel 1 bisa diketahui bahwa sebagian besar perubahan yang terjadi pada otot rangka yang mengarah pada proses pelunakan daging adalah sebagai hasil aktivitas proteolisis.

Tabel 1. Perubahan penting yang terjadi pada otot rangka selama pelayuan pada suhu 2 – 4°C

1. Melemahnya struktur Z-disk yang menyebabkan terjadinya fragmentasi miofibril.
2. Hilangnya troponin-T yang disertai munculnya polipeptida dengan berat molekul 28 – 32 kDa. Meskipun hal ini banyak dipublikasikan namun hubungan yang jelas antara troponin-T dan kelunakan daging belum diketahui secara pasti.
3. Degradasi desmin yang menyebabkan fragmentasi miofibril yang mungkin disebabkan oleh rusaknya ikatan silang transversal antar miofibril.
4. Degradasi titin, namun hubungannya dengan kelunakan daging belum bisa dipastikan.
5. Degradasi nebulin, namun hubungannya dengan kelunakan daging belum bisa dipastikan.
6. Munculnya polipeptida dengan ukuran 95.000 kDa, kemungkinan berasal dari degradasi protein miofibril dengan berat molekul lebih dari 95.000 kDa, namun hingga kini hubungannya dengan kelunakan daging belum terbukti.
7. Barangkali yang penting diketahui adalah miosin dan aktin tidak mengalami banyak perubahan selama pelayuan hingga 56 hari.

Sumber: Goll et al. (1983); Robson and Huiatt (1983); Koohmaraie (1988)

Untuk mendukung pernyataan bahwa proteolisis memiliki peran utama dalam proses pelunakan daging selama pelayuan maka perlu disajikan beberapa hasil penelitian yang telah dipublikasi (Tabel 2). Whipple et al. (1990) dan Shackelford et al. (1991) menyatakan bahwa perbedaan tingkat kelunakan daging sapi *Bos taurus* (jenis lunak) dan *Bos indicus* (jenis keras) adalah pada laju degradasi protein miofibril selama pelayuan. Perbedaan laju pelunakan daging selama pelayuan dan aktivitas proteolisis dalam otot rangka pada babi, domba dan sapi nampaknya disebabkan oleh perbedaan laju degradasi protein miofibril. Jadi hasil penelitian banyak yang mendukung bahwa proteolisis pada protein miofibril tertentu merupakan penyebab utama terjadinya perubahan struktur dalam otot lurik yang mengarah ke rusaknya integritas sel-sel otot yang mengakibatkan terjadinya pelunakan tekstur daging.

Otot rangka tersusun dari tiga macam kelompok protein yaitu protein sarkoplasma, jaringan pengikat dan miofibril. Meskipun protein sarkoplasma mengalami degradasi selama pelayuan namun hal itu tidak ada kaitan langsung dengan pelunakan daging. Demikian pula perubahan proteolisis pada jaringan pengikat khususnya kolagen selama pelayuan

ternyata juga minimal (Tarrant, 1987). Namun demikian sudah banyak diketahui bahwa jaringan pengikat sangat menentukan tingkat kelunakan daging khususnya pada hewan ternak dengan usia yang berbeda. Oleh karena itu proses pelunakan daging selama pelayuan lebih banyak berkaitan dengan aktivitas proteolisis protein miofibril.

Tabel 2. Hasil penelitian yang menunjukkan peran proteolisis selama pelayuan terhadap proses pelunakan daging

1. Inkubasi sayatan otot rangka dalam larutan kalsium klorida menginduksi terjadinya proteolisis protein miofibril dan fragmentasi miofibril. Namun inkubasi sayatan otot rangka dalam larutan mengandung pengikat ion kalsium (Ca chelator) misalnya EDTA dan EGTA ternyata dapat mencegah fragmentasi miofibril maupun menghambat proteolisis protein miofibril.
2. Infusi karkas dengan larutan kalsium klorida dapat memacu degradasi protein miofibril, sehingga tahap pelayuan karkas yang memerlukan waktu berhari-hari untuk memperoleh daging yang lunak bisa diperpendek atau bahkan tidak lagi diperlukan.
3. Infusi karkas dengan larutan ZnCl₂ menghambat seluruh aktivitas proteolisis pada protein miofibril, fragmentasi miofibril dan pelunakan daging.
4. Otot rangka dari kambing yang diberi pakan mengandung β -adrenergic agonist (BAA) yang tidak mengalami proteolisis selama pelayuan (tidak terjadi fragmentasi miofibril) ternyata lebih keras dari otot rangka dari kambing yang tidak diberi pakan BAA. Infusi larutan CaCl₂ pada karkas dari kambing yang diberi pakan BAA dapat menginduksi degradasi protein miofibril dan tekstur daging lebih lunak.

Sumber: Koohmaraie et al. (1988a; 1988b), Koohmaraie et al. (1989), Koohmaraie et al. (1990), Koohmaraie (1990), Fiems et al. (1990), Kretchmar et al. (1990), Koohmaraie et al. (1991), Koohmaraie and Shackelford (1991).

Enzim-enzim protease harus mempunyai karakteristik tertentu untuk bisa berperan dalam pelunakan daging selama pelayuan. Protease tersebut harus: (a) terletak di dalam sel otot rangka, (b) memiliki kesempatan untuk berhubungan langsung dengan substratnya (protein miofibril), (c) memiliki kemampuan menghidrolisa protein yang sama meskipun dalam kondisi in vitro. Apabila ada sistem proteolitik yang memiliki ketiga karakteristik tersebut maka akan sangat bermanfaat dalam proses pelunakan daging.

Ada beberapa macam protease di dalam sel otot rangka, namun sejauh ini hanya protease sitosolik (kalpain) dan protease lisosomal (katepsin) yang memiliki peran dalam mendegradasi protein miofibril (Rivett, 1989). Oleh karena itu banyak penelitian yang diarahkan untuk mengkaji lebih dalam lagi tentang peran dari kedua macam protease tersebut pada proteolisis selama pelayuan daging. Namun demikian hal ini bukan berarti tidak ada lagi kemungkinan peran dari sistem proteolitik lain dalam proses pelunakan daging.

Meskipun katepsin dapat mendegradasi miosin secara efisien, miosin tidak terdegradasi selama proses pelayuan (Tabel 3). Oleh karena itu peranan dari katepsin dalam proses pelunakan daging selama pelayuan bisa dianggap tidak nyata. Katepsin ini terdiri dari enzim-enzim protease yang biasanya terkandung di dalam lisosoma. Diasumsikan bahwa katepsin tersebut selama pelayuan akan dilepas dari lisosoma menuju protein miofibril di dalam sitosol. Namun sejauh ini belum ada bukti yang mendukung kebenaran asumsi tersebut. Satu-satunya penelitian yang relevan dengan hal itu menunjukkan bahwa pelayuan selama 28 hari pun tidak terjadi pelepasan katepsin dari lisosoma (LaCourt et al., 1986).

Tabel 3. Pengaruh pelayuan pada suhu 2–4°C, kalpain dan katepsin terhadap integritas miofibril

Komponen miofibril	Pelayuan	Kalpain	Katepsi
Z-disk	+	+	±
Titin	+	+	+
Nebulin	+	+	+
Miosin	-	-	+
α-Aktinin	-	-	+
Desmin	+	+	-
Aktin	-	-	+
Troponin-T	+	+	+

Keterangan: + : Terdegradasi - : Tidak terdegradasi

Sumber: Goll et al. (1983); Robson and Huiatt (1983); Koochmaraie (1988); Mikami et al. (1987)

Banyak hasil penelitian yang mendukung hipotesis bahwa kalpain merupakan enzim utama yang berperan dalam proteolisis selama pelayuan dan proses pelunakan. Adapun sifat-sifat dari kalpain yang sudah diketahui antara lain yaitu aktivitas proteolisisnya yang spesifik yang menyebabkan terlepasnya miofilamen dari miofibril. Proporsi miofilamen yang terlepas dari miofibril meningkat dengan tersedianya Ca^{2+} yang berlebihan dan bisa berkurang apabila ada senyawa lain yang menghambat aktivitas kalpain. Kalpain secara spesifik mendegradasi Z-disk, sebaliknya tidak mampu mendegradasi miosin dan aktin yang belum terdenaturasi. Aktivitas kalpain mencapai optimum pada kondisi pH dan kekuatan ionik intraseluler, tetapi kurang optimum pada konsentrasi Ca^{2+} intraseluler. Di samping itu kalpain tidak mendegradasi protein miofibril menjadi asam amino, diduga protease lain yang mampu mendegradasi miofilamen menjadi asam amino (Goll et al., 1992).

Lebih lanjut diketahui bahwa kalpain terdiri dari sedikitnya empat macam protein yaitu μ -kalpain

(memerlukan 5 – 70 μM Ca^{2+} untuk aktivitasnya), m-kalpain (memerlukan 100 – 2000 μM Ca^{2+} untuk aktivitasnya), kalpain yang memerlukan Ca^{2+} lebih tinggi lagi, dan kalpastatin yang merupakan penghambat spesifik terhadap kalpain. Ketiga macam kalpain memerlukan Ca^{2+} dalam aktivitas reaksinya, demikian pula Ca^{2+} diperlukan oleh kalpastatin untuk bisa berikatan dengan kalpain yang sekaligus menghambat aktivitasnya (Goll et al., 1992). Perlu diketahui bahwa konsentrasi Ca^{2+} intraseluler hanya berkisar antara 0,2 – 0,8 μM .

Penelitian yang mengkaitkan ion kalsium dengan pelunakan daging sudah diawali oleh Davey and Gilbert (1969). Mereka melaporkan bahwa melemahnya dan hilangnya Z-disk selama pelayuan ternyata dapat dihambat oleh EDTA. Oleh karena itu mereka menduga bahwa EDTA dapat memberikan penghambatan karena salah satu fungsinya sebagai pengikat ion kalsium. Hasil penelitian tersebut lebih lanjut diperkuat oleh Busch et al. (1972) dan Koochmaraie et al. (1988a). Busch et al. (1972) menunjukkan bahwa fragmentasi miofibril dihambat oleh adanya EDTA, namun justru terinduksi bila tersedia ion kalsium. Koochmaraie et al. (1988a) menunjukkan bahwa hilangnya Z-disk dan terjadinya fragmentasi miofibril bisa terhambat oleh adanya EDTA sebagai pengikat ion-ion logam divalen maupun EGTA sebagai pengikat spesifik ion kalsium yang berada tercampur dengan ion magnesium; sebaliknya fragmentasi tersebut justru makin dipacu bila tersedia Ca^{2+} dari $CaCl_2$. Oleh karena itu untuk sementara ini dapat disimpulkan bahwa kenaikan kadar Ca^{2+} menyebabkan berlangsungnya proses pelunakan daging selama pelayuan.

Koochmaraie et al. (1988b) mencoba untuk menerapkan hasil penelitian tersebut pada sapi. Mereka menginjeksikan larutan kalsium klorida melalui saluran pembuluh darah sesaat setelah sapi disembelih. Hasilnya menunjukkan bahwa proses pelunakan daging mencapai puncaknya setelah dilayukan hanya 24 jam, sedangkan pelayuan yang bisa dilakukan tanpa injeksi kalsium klorida memerlukan waktu sekitar 7 – 14 hari. Mereka selanjutnya menitikberatkan penelitiannya untuk mengetahui lebih mendalam lagi tentang mekanisme aksi dari ion kalsium. Diduga paling tidak ada tiga mekanisme yang mungkin bisa digunakan untuk menerangkan peran ion kalsium dalam proses pelunakan daging. Pertama, terjadinya pelarutan protein (salting-in) oleh adanya larutan kalsium klorida yang diinjeksikan. Kedua, melemahnya protein struktural penyusun Z-disk akibat reaksi non-enzimatis. Ketiga, aktivasi kalpain.

Untuk menentukan kebenaran dari dugaan bahwa kenaikan konsentrasi ion menyebabkan terjadinya 'salting-in' dari protein maka karkas diinfusi dengan kalsium klorida

maupun natrium klorida dengan kekuatan ionik yang setara. Infusi karkas dengan larutan natrium klorida ternyata tidak mampu memacu aktivitas proteolisis atau proses pelunakan daging (Koochmariaie et al., 1989). Oleh karena itu disimpulkan bahwa proses pelunakan yang lebih singkat pada karkas yang diinfusi dengan kalsium klorida adalah disebabkan oleh peran ion kalsium dan bukan disebabkan oleh meningkatnya kekuatan ionik.

Taylor and Etherington (1991) meneliti lebih lanjut untuk mengetahui peran ion kalsium. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi pelarutan sebagian dari protein miofibril, meskipun demikian terlarutnya sebagian protein miofibril tersebut ternyata tidak berpengaruh terhadap stabilitas Z-disk. Oleh karena itu hal ini tidak akan berpengaruh secara nyata terhadap kelunakan daging.

Kemungkinan yang lain dari pengaruh kenaikan kadar kalsium, baik yang berasal dari mitokondria dan retikulum sarkoplasma (endogenus) maupun dari infusi kalsium (eksogenus), adalah merupakan reaksi non-enzimatis (Hattori and Takashi, 1979; 1982; Takashi et al., 1987). Untuk membuktikan dugaan tersebut maka Koochmariaie (1990) menginfusikan larutan $ZnCl_2$ kedalam karkas domba sesaat setelah disembelih. Guroff (1964) melaporkan bahwa $ZnCl_2$ merupakan penghambat aktivitas kalpain. Oleh karena itu apabila memang betul terjadi proses pelunakan daging yang ditimbulkan oleh reaksi non-enzimatis dari ion kalsium, maka proses pelunakan tersebut tidak akan dipengaruhi oleh adanya $ZnCl_2$ yang diinfusikan ke dalam karkas. Hasil penelitian Koochmariaie (1990) membuktikan bahwa tidak terjadi proteolisis pada protein miofibril, fragmentasi miofibril maupun pelunakan daging pada karkas yang diinfusi dengan $ZnCl_2$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aksi dari Ca^{2+} baik endogenus maupun eksogenus dimediasi melalui sistem proteolisis kalpain.

Alarcon-Rojo and Dransfield (1989) menyatakan bahwa proses pelunakan daging yang dipacu oleh infusi kalsium klorida ternyata bisa dihambat oleh adanya N-acetyl-leu-leu-norleucinal yang merupakan penghambat aktivitas kalpain. Di samping itu penghambat kalpain tersebut ternyata tidak menghambat aktivitas katepsin. Besar kemungkinannya bahwa Ca^{2+} masih memiliki aksi yang lain dan hingga kini belum bisa dijelaskan, namun demikian bukti-bukti dari penelitian sebelumnya bisa untuk memastikan bahwa peranan Ca^{2+} dalam pelunakan daging dimediasikan oleh sistem proteolitik kalpain.

PENGENDALIAN AKTIVITAS KALPAIN

Perubahan dari otot (muscle) pada hewan yang masih hidup menjadi daging (meat) setelah hewan disembelih

merupakan hal yang kompleks karena mencakup perubahan metabolik, fisik maupun struktur. Biasanya setelah hewan disembelih, dikeluarkan darahnya, serta diambil isi perutnya selanjutnya karkasnya dilayukan pada suhu $1^{\circ}C$. Berhubung suplai oksigen ke seluruh jaringan sudah tidak ada lagi maka tidak bisa lagi dihasilkan energi. Di samping itu proses glikolisis terus berlanjut dan menghasilkan metabolit glikolisa yang makin menumpuk dan tidak bisa dihilangkan. Salah satu metabolit yang terakumulasi adalah asam laktat yang menyebabkan penurunan pH dari 7,0 menjadi 5,6 dalam selang waktu sekitar 24 jam. Pada selang waktu yang sama temperatur karkas juga turun dari $37^{\circ}C$ menjadi sekitar $2^{\circ}C$. Kombinasi dari beberapa perubahan ini menyebabkan terciptanya kondisi lingkungan baru yang berbeda dengan kondisi pada jaringan yang masih hidup. Perbahan kondisi inilah yang diduga sangat berpengaruh terhadap kemampuan dari sistem proteolisis selama pelayuan.

Salah satu contoh yaitu terjadinya kenaikan kadar Ca^{2+} yang dilepaskan dari dalam mitokondria maupun retikulum sarkoplasma. Sebagai perbandingan yaitu bahwa kadar Ca^{2+} pada otot dalam keadaan istirahat dan masih hidup adalah kurang dari $1 \mu M$, sedangkan konsentrasi Ca^{2+} pada otot setelah menjadi karkas bisa mencapai $100 \mu M$. Oleh karena itu penurunan pH, penurunan suhu dan kenaikan konsentrasi Ca^{2+} tentunya akan memiliki pengaruh yang sangat dominan terhadap sistem proteolisis endogenus. Sebagai contohnya yaitu protease serin hampir seluruhnya menjadi inaktif pada kondisi pH dibawah 6,0, sedangkan kondisi ini justru sangat sesuai untuk berlangsungnya aktivitas proteolisis lain seperti kalpain dan katepsin.

Hingga kini masih timbul perdebatan mengenai fungsi kalpain dalam jaringan otot. Hal ini disebabkan oleh adanya hasil penelitian yang menunjukkan bahwa konsentrasi kalsium yang diperlukan untuk aktivitas proteolisis kalpain ternyata jauh lebih tinggi ($10 \mu M$ untuk μ -kalpain dan $200 - 300 \mu M$ untuk m-kalpain) dibandingkan dengan konsentrasi kalsium dalam jaringan otot yang masih hidup ($< 1 \mu M$). Selain itu konsentrasi kalsium yang diperlukan oleh kalpastatin untuk berikatan dengan kalpain ternyata lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi kalsium yang diperlukan untuk aktivitas kalpain (Goll et al., 1992). Namun demikian argumentasi ini dinilai kurang tepat bila diterapkan pada karkas selama pelayuan, karena dalam kondisi *post mortem* konsentrasi kalsium dalam otot cukup untuk mengaktifkan μ -kalpain. Di samping itu penurunan suhu dan pH ternyata berpengaruh terhadap tingkat penghambatan kalpastatin terhadap aktivitas μ -kalpain. George et al., (1991) menunjukkan bahwa pada suhu $25^{\circ}C$ dan pH 7,5 terjadi 87% penghambatan sedangkan pada pH 5,7 terjadi 55% penghambatan oleh kalpas-

tatin; pada suhu 5°C dan pH 7,5 terjadi 59% penghambatan sedangkan pada pH 5,7 terjadi 6% penghambatan oleh kalpastatin.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam kondisi *post mortem* yang wajar (pelayuan pada suhu 2°C selama 14 hari) ternyata m-kalpain terbukti masih stabil aktivitasnya, sedangkan kalpastatin dan μ -kalpain aktivitasnya cepat sekali mengalami penurunan (Koochmaraie et al., 1987; Vidalenc et al., 1983; Ducastaing et al., 1985). Baik kalpastatin maupun μ -kalpain keduanya mengalami autolisis dengan adanya kalsium yang cukup dan mengakibatkan aktivitasnya hilang (Guroff, 1964; Suzuki et al., 1981a; Suzuki et al., 1981b; Hathaway et al., 1982; Mellgren et al., 1982; Parkes et al., 1985; De Martino et al., 1986; Imajoh et al., 1986; Inomata et al., 1986, Crawford et al., 1987). Namun demikian hilangnya aktivitas enzim tersebut sangatlah tergantung pada suhu (Koochmaraie et al., 1989) dan tingkat kehilangan aktivitas enzim tersebut bisa diperkecil dengan adanya substrat (De Martino et al., 1986). Selanjutnya Koochmaraie et al. (1987) menyatakan bahwa penyebab hilangnya aktivitas μ -kalpain selama pelayuan karena terjadi autolisis yang disebabkan oleh kenaikan konsentrasi kalsium dalam kondisi *post mortem*.

Meskipun hal tersebut di atas bisa merupakan sebuah hipotesis (kenaikan konsentrasi kalsium mengaktifkan μ -kalpain yang selanjutnya menghidrolisa protein miofibril yang bisa digunakan sebagai substrat, dengan semakin berkurangnya substrat tersebut maka μ -kalpain akan mengalami autolisis yang mengakibatkan menjadi inaktif), namun ada kemungkinan lain bahwa inaktivasi tersebut oleh hidrolisis oleh protease lain. Oleh karena itu kedua hipotesis tersebut perlu dikaji lebih lanjut.

Komponen yang ketiga dari sistem proteolisis kalpain adalah kalpastatin yang secara spesifik menghambat aktivitas kalpain. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa kalpastatin merupakan salah satu pengendali aktivitas kalpain pada otot *post mortem*. Pertama, infusi karkas dengan $ZnCl_2$, yang dapat mencegah proteolisis dan pelunakan daging selama pelayuan ternyata dapat menghalangi proses inaktivasi kalpastatin (Koochmaraie, 1990). Kedua, infusi karkas dengan larutan kalsium klorida yang menyebabkan akselerasi proteolisis dan proses pelunakan, juga dapat memacu inaktivasi kalpastatin (Koochmaraie et al., 1988b; 1989). Ketiga, laju inaktivasi kalpastatin memiliki korelasi yang nyata dengan laju proteolisis selama pelayuan dan kelunakan daging dari *Bos indicus* (Whipple et al., 1990; Shackelford et al., 1991) dan daging dari hewan yang diberi pakan BAA (Kretchmar et al., 1990; Koochmaraie et al., 1991a). Keempat, perbedaan antara laju proteolisis *post mortem* dan proses pelunakan

daging dari berbagai spesies berkorelasi negatif dengan aktivitas kalpastatinnya (Koochmaraie et al., 1991b; Ouali and Talmant, 1990). Berdasarkan hasil penelitian tersebut di atas maka semakin jelas bahwa kalpastatin berperan sebagai pengendali terhadap aktivitas kalpain. Diduga bahwa inaktivasi kalpastatin melibatkan suatu proses enzimatis (protease) dan protease tersebut teraktivasi oleh adanya kalsium, namun justru terhambat oleh adanya Zn.

Dari publikasi yang dibahas di atas maka jelaslah bahwa pengetahuan tentang pengendalian aktivitas kalpain selama *post mortem* masih relatif sedikit, sebaliknya masih banyak yang belum diketahui. Meskipun upaya untuk mengukur kuantitas komponen-komponen dari sistem proteolisis kalpain adalah bermanfaat, namun hasil kuantifikasi tersebut harus diinterpretasikan dengan hati-hati, mengingat aktivitas proteolisis yang terukur dengan yang sesungguhnya dalam kondisi *in situ* bisa sangat berbeda. Salah satu contoh yang tepat sebagai ilustrasi yaitu aktivitas kalpain di dalam otot merah (slow-twitch) dan otot putih (fast twitch). Aktivitas μ -kalpain, m-kalpain dan kalpastatin diketahui sama atau bahkan bisa lebih di dalam otot merah dari pada di dalam otot putih (Quali and Talmant, 1991). Juga telah ditunjukkan bahwa proteolisis selama pelayuan dan proses pelunakan tidak terjadi pada otot merah. Oleh karena itu timbul masalah bahwa besarnya kadar kalpain yang terkandung dalam otot tidak sejalan dengan peran yang dimainkan oleh kalpain dalam proteolisis selama pelayuan (Ouali, 1990). Namun Cassens et al. (1967) membuktikan bahwa otot merah memiliki kadar Zn yang tiga atau empat kali lebih tinggi dari pada kadarnya di dalam otot putih. Mereka melaporkan bahwa sebagian besar dari Zn di dalam otot berada dalam fraksi yang terdiri dari miofibril dan nuklei. Selanjutnya Konodo et al. (1991) menyatakan bahwa otot merah mengandung Zn empat kali lebih tinggi daripada kadarnya di dalam otot putih. Oleh karena itu tingginya kadar Zn dalam otot merah diduga sebagai salah satu penyebab tidak berlangsungnya proteolisis dan proses pelunakan dalam otot merah (Olson et al., 1976; Koochmaraie, et al., 1988c).

Masih ada faktor lain selain Zn yang mungkin terlibat dalam pengendalian aktivitas kalpain selama pelayuan yaitu kemungkinan adanya pengaktif kalpain (calpain activator). De Martino and Blumenthal (1982) ketika meneliti peran kalmodulin terhadap aktivitas kalpain di dalam otak, telah mengidentifikasi adanya suatu protein yang mampu menstimulasi aktivitas μ -kalpain dan m-kalpain. Protein tersebut mampu meningkatkan aktivitas kedua kalpain tersebut setinggi 25 kali semula tanpa adanya perubahan kadar kalsium yang diperlukan. Pontremoli et al. (1990) telah berhasil mengisolasi aktivator dari otot

rangka kelinci, namun pertanyaan tentang keberadaan aktivator dalam otot rangka pada hewan ternak pedaging masih belum terjawab.

Faktor lain yang diduga juga bisa berperan terhadap pengendalian aktivitas kalpain adalah karnosin, anserin dan L-1-metil-histidin yang diketahui keberadaannya di dalam otot dengan konsentrasi tinggi (mM) (Crush, 1970; Margolis, 1974). Johnson and Hammer (1989) melaporkan bahwa ketiga dipeptida tersebut sebagai pengaktif kalpain yang lemah. Dilaporkan juga bahwa karnosin meningkatkan aktivitas penghambatan dari kalpastatin, sedangkan untuk anserin dan L-1-metil-metionin menurunkan aktivitas penghambatan kalpastatin. Hal ini memperjelas bahwa meskipun kandungan kalpain dalam otot merah dan otot putih bisa sama, namun keduanya belum tentu memiliki kapasitas proteolisis yang sama, sehingga data tersebut harus diinterpretasikan dengan hati-hati.

KESIMPULAN

Berdasarkan publikasi hasil penelitian yang dibahas dalam review ini maka bisa disimpulkan bahwa perubahan *post-mortem* yang mengarah ke pelunakan daging disebabkan oleh terjadinya proteolisis pada protein utama penyusun miofibril. Data yang ada menunjukkan bahwa sistem proteolisis kalpain memiliki peran yang dominan terhadap berlangsungnya proteolisis selama pelayuan. Sebab utama terjadinya perbedaan laju pelunakan daging selama pelayuan yaitu adanya perbedaan laju degradasi protein penyusun miofibril yang dimediasi oleh sistem proteolisis kalpain. Selanjutnya apabila hipotesis tentang rangkaian proteolisis dan proses pelunakan daging selama pelayuan itu benar maka hal ini bisa dikembangkan untuk menghasilkan prosedur baru untuk memacu pelunakan daging setelah *post mortem*.

DAFTAR PUSTAKA

Alarcon-Rojo, A. and Dransfield, E. 1989. Effect of calcium ions on texture of beef during conditioning. Proc. Intl. Cong. Meat Sci. and Technol., Copenhagen, 35: 1141 – 1144.

Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E., and Suzuki, A. 1972. A. 1972. Ca²⁺-specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol. 52: 367 – 381.

Cassens, R.G., Hoekstra, W.G., Faltin, E.C., and Briskey, E.J. 1967. Zinc content and subcellular distribution in red versus white porcine muscle. Am. J. Physiol. 212: 668 – 692.

Crawford, C., Willis, A.C., and Gagnon, J. 1987. The effects of autolysis on the structure of chicken calpain II. Biochem. J. 248: 579 – 588.

Crush, K.G. 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. Comp. Biochem. Physiol. 34: 3 – 30.

Davey, C.L. and Gilbert, K.V. 1969. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. J. Food Sci. 34: 69 – 74.

DeMartino, G.N. and Blumenthal, D.K. 1982. Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases. Biochemistry. 21: 4197 – 4303.

DeMartino, G.N., Huff, C.A., and Croall, D.E. 1986. Autoproteolysis of the small sub unit of calcium-dependent protease II activates and regulates protease activity. J. Biol. Chem. 261: 12047 – 12052.

Ducastaing, A., Valin, C., Schollmeyer, J., and Cross, R. 1985. Effects of electrical stimulation on *post mortem* changes in the activities of two Ca-dependent neutral proteinases and their inhibitor in beef muscle. Meat Sci. 15: 193 – 202.

Fiems, L.O., Buts, B., Boucque, C.V., Demeyer, D.I., and Cottyn, B.G. 1990. Effect of a beta-agonist on meat quality and myofibrillar protein fragmentation in bulls. J. Meat Sci. 27: 29 – 39.

George, S.M., Calkins, C.R., and Koohmaraie, M. 1991. Inhibition of crude purified μ -calpain by calpastatin. J. Anim. Sci. 69(Suppl. 1): 336.

Goll, D.E., Otsuka, Y., Nagainis, P.A., Shannon, J.D., Sathe, S.K., and Muguruma, M. 1983. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. J. Food Biochem. 7: 137 – 177.

Goll, D.E., Thompson, V.J., Taylor, R.G., and Christiansen, J.A. 1992. Properties and regulation of the calpain system and its role in muscle growth. Biochimie. 74: 225 – 237.

Guroff, G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. J. Biol. Chem. 239: 149 – 155.

Hathaway, D.R., Werth, D., and Haeberle, J.R. 1982. Limited autolysis reduces the Ca²⁺ requirement of a smooth muscle Ca²⁺-activated protease. J. Biol. Chem. 257: 9072 – 9077.

Hattori, A. and Takahashi, K. 1979. Studies on the *post mortem* fragmentation of myofibrils. J. Biochem. 85: 47 – 56.

Hattori, A. and Takahashi, K. 1982. Calcium-induced weakening of skeletal muscle Z-disks. J. Biochem. 92: 381 – 390.

Imajoh, S., Kawasaki, H., and Suzuki, K. 1986. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP) reduction of the Ca²⁺-requirement is due to the NH₂-terminal processing of the large subunit. J. Biochem. 100: 633 – 642.

Inomata, M., Imahori, K., and Kawashima, S. 1986. Autolytic activation of calcium-activated neutral protease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 638 – 643.

Johnson, P.J. and Hammer, J.L. 1989. Effect of L-1-methyl-histidine and the muscle dipeptides Carnosine and anserine on the activities of muscle calpains. Comp. Biochem. Physiol. 94B: 45 – 48.

Kondo, H., Kimura, M., and Itokawa, Y. 1991. Manganese, copper, zinc, and iron concentrations and subcellular distribution in two types of skeletal muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 196: 83 – 88.

- Koohmaraie, M., Seideman, S.C., Schollmeyer, J.E., Dutson, T.R., and Crouse, J.D. 1987. Effect of post mortem storage on Ca²⁺-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Sci.* 19: 187 – 196.
- Koohmaraie, M. 1988. The role of endogenous proteases in meat tenderness. *Rec. Meat Conf. Proc.* 41: 89 – 100.
- Koohmaraie, M., Babiker, A.S., Merkel, R.A., and Dutson, T.R. 1988a. Role of Ca²⁺ dependent protease and lysosomal enzymes in *post mortem* changes in bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.* 53: 1253 – 1257.
- Koohmaraie, M., Babiker, A.S., Schroeder, A.L., Merkel, R.A., and Dutson, T.R. 1988b. Acceleration of *post mortem* tenderization in ovine carcasses through activation of Ca²⁺-dependent protease. *J. Food Sci.* 53: 1638 – 1641.
- Koohmaraie, M., Seideman, S.C., Schollmeyer, J.E., Dutson, T.R., and Babiker, A.S. 1988c. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *J. Food Sci.* 53: 407 – 410.
- Koohmaraie, M., Crouse, J.D., and Mersmann, H.J. 1989. Acceleration of *post mortem* tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: Effect of concentration and ionic strength. *J. Anim. Sci.* 67: 934 – 942.
- Koohmaraie, M. 1990. Inhibition of *post mortem* tenderization in ovine carcasses through infusion of zinc. *J. Anim. Sci.* 68: 1476 – 1483.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., and Crouse, J.D. 1990. Acceleration of *post mortem* tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride. *J. Anim. Sci.* 68: 1278 – 1283.
- Koohmaraie, M. and Shackelford, S. 1991. Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed with a β -adrenergic agonist. *J. Anim. Sci.* 69: 2463 – 2471.
- Koohmaraie, M., Shackelford, S., Muggli-Cockett, N.E., and Stone, R.T. 1991. Effect of a beta-adrenergic agonist L_{644,969} on muscle growth, endogenous proteinase activities and *post mortem* proteolysis in weather lambs. *J. Anim. Sci.* 69: 4823 – 4835.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D., and Mersmann, H.J. 1991. Post mortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69: 617 – 624.
- Kretchmar, D.H., Hathaway, M.R., Epley, R.J., and Dayton, W.R. 1990. Alterations in *post mortem* degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a beta-adrenergic agonist. *J. Anim. Sci.* 68: 1760 – 1772.
- LaCourt, A.A., Oblad, A., Deval, C., Ouali, A., and Valin, C. 1986. Post mortem localization of lysosomal peptide hydrolase. Cathepsin B. In "Cysteine Proteinases and Their Inhibitors" (V. Turk, ed.), Walter de Gruyter and Co., New York, 239 – 248.
- Margolis, F. 1974. Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science.* 184: 909 – 911.
- Marsh, B.B., Russell, R.L., Swartz, D.R., and Ringkob, T.P. 1988. Letters to the Editor. *Meat Sci.* 24: 227 – 232.
- Mellgren, R.L., Repetti, A., Muck, T.C., and Reinmann, E.M. 1982. Rabbit skeletal muscle calcium-dependent protease requiring millimolar Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 257: 7203 – 7209.
- Mikami, M., Whithing, A.H., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., and Etherington, D.J. 1987. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. *Meat Sci.* 21: 81 – 97.
- Olson, D.G., Parrish, F.C.Jr., and Stromer, M.H. 1976. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during *post mortem* storage. *J. Food Sci.* 41: 1036 – 1041.
- Ouali, A. 1990. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods.* 1: 129 – 165.
- Ouali, A. and Talmant, A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.* 28: 331 – 348.
- Parkes, C., Kembhavi, A.A., and Barratt, A.J. 1985. Calpain inhibition by peptide epoxides. *Biochem. J.* 230: 509 – 516.
- Pontremoli, S., Viotti, P.L., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., and Melloni, E. 1990. Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171: 569 – 547.
- Rivett, A.J. The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 1 – 8.
- Robson, R.M. and Huiatt, T.W. 1983. Roles of the cytoskeletal proteins desmin, titin and nebulin in muscle. *Rec. Meat Conf. Proc.* 36: 116 – 124.
- Shackelford, S., Koohmaraie, M., Miller, M.F., Crouse, J.D., and Reagan, J.O. 1991. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford *versus* Brahman crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 69: 171 – 177.
- Suzuki, K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Y., Kubota, S., and Imahori, K. 1981. Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J. Biochem.* 90: 1787 – 1793.
- Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y., and Imahori, K. 1981. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J. Biochem.* 90: 275 – 278.
- Takahashi, K., Kim, O.H., and Yano, K. 1987. Calcium-induced weakening of Z-disk in *post mortem* skeletal muscle. *J. Biochem.* 101: 767 – 773.
- Taylor, M.A.J. and Etherington, D.J. 1991. The solubilization of myofibrillar proteins by calcium ions. *Meat Sci.* 29: 211 – 219.
- Vidalenc, P., Cottin, P., Merdaci, N., and Ducastaing, A. 1983. Stability of two Ca²⁺-dependent neutral proteinases and their specific inhibitor during *post mortem* storage of rabbit skeletal muscle. *J. Sci. Food Agric.* 34: 1241 – 1250.
- Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M.E., Crouse, J.D., Hunt, M.C., and Klemm, R.D. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 68: 2716 – 2728.