

Kinetika Oksidasi Protein Ikan Kakap (*Lutjanus sp*) Selama Penyimpanan

Kinetic of Protein Oxidation from Fish Snapper (*Lutjanus sp*) during Storage

Rahim Husain¹, S. Suparmo², Eni Harmayani², Chusnul Hidayat²

¹Fakultas Ilmu-Ilmu Pertanian, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jenderal Sudirman, No. 6, Kota Gorontalo 96182, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia
Email: imrahim76@yahoo.co.id

Submisi: 10 Juli 2015; Penerimaan: 17 Mei 2016

ABSTRAK

Protein ikan mudah rusak akibat oksidasi selama penyimpanan. Kecepatan reaksi oksidasi dapat didekati melalui orde ke nol maupun orde pertama. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari oksidasi selama penyimpanan dengan menentukan besaran energi aktivasi (E_a) dan konstanta perubahan (k). Hasil menunjukkan bahwa nilai k meningkat dari 0,0617 menjadi 0,311 dengan peningkatan suhu dari 0 °C ke 40 °C. Energi aktivasi reaksi oksidasi yang menyebabkan terjadinya oksidasi protein adalah 42,015 KJ/mol.K untuk orde nol. Kinetika peningkatan protein karbonil: semakin tinggi suhu penyimpanan protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) semakin besar nilai konstanta (k) yang diperoleh. Studi kinetika juga memperlihatkan bahwa peningkatan laju reaksi kerusakan oksidasi protein ikan kakap selama penyimpanan mengikuti reaksi orde ke nol atau reaksi berjalan lambat.

Kata kunci: Energi aktivasi; protein ikan; kinetika reaksi ordo nol; reaksi orde pertama

ABSTRACT

Fish protein is oxidised easily during storage. The oxidation reaction rate can be approached through the order to zero or first order. The objective of this research was to study the oxidation rate during storage by determining the amount of activation energy (E_a) and constant change (k). The results showed that the increased of temperature storage from 0 °C to 40 °C can increased the k value from 0.0617 to 0.311. The carbonyl content of red snapper protein isolate can be increased to higher level as storage temperature increase to 40 °C with higher level increase at higher temperature. The activation energy of oxidation reactions that cause oxidation of the protein is 42.015 KJ/mol.K to zero order. Kinetics increase in protein carbonyls: the higher the temperature storage protein isolate red snapper (*Lutjanus sp*), the greater the value of a constant (k) is obtained. Kinetics studies show that an increase in the rate of reaction of oxidative damage fish protein during storage by following zero order reactions.

Keywords: Activation energy; fish protein; kinetics reaction of zero order; first-order reaction

PENDAHULUAN

Protein ikan mempunyai nilai ekonomi tinggi bagi industri ikan, memperbaiki stabilitas dan fungsional dari produk ikan. Protein ikan dalam bentuk konsentrat telah

digunakan sebagai suplementasi bahan pangan berprotein rendah untuk golongan rawan gizi (Wang dkk., 2010). Menurut Mercier dkk. (2011) penelitian oksidasi protein relatif baru dan pembentukan karbonil merupakan salah satu perubahan yang paling menonjol dalam protein teroksidasi.

Selanjutnya Varelzisk dkk. (2008) dan Kjarsgard dkk. (2006) menyatakan jika protein karbonil yang dihasilkan oleh oksidasi langsung dari rantai samping asam amino, karbonil eksogen dapat dihubungkan ke protein dengan reaksi 4-OH nonenal, atau dengan reaksi mengurangi gula. Sedangkan Baron dkk. (2007) menyatakan bahwa oksidasi pada protein juga menyebabkan penurunan kelompok sulfhidril, oksidasi aromatik yang menginduksi modifikasi dari sifat biologis seperti hilangnya aktivitas enzimatis, perubahan kelarutan dan/atau peningkatan kerentanan proteolitik.

Degradasi nutrisi dapat dihitung dengan cara yang sama oleh inaktivasi mikroba. Secara umum kinetika degradasi nutrisi mengikuti orde nol dan orde pertama. Kinetika telah digunakan dalam ilmu makanan untuk menggambarkan seberapa cepat reaksi berubah jika produk disimpan pada suhu tinggi. Jika parameter kinetik diketahui, maka kinetika dapat digunakan untuk memprediksi umur simpan produk. Umumnya, degradasi nutrisi di bawah kondisi isothermal dapat diwakili oleh Persamaan 1.

$$\frac{dc}{dt} = -k(C)^n \tag{1}$$

di mana k adalah laju konstan, C adalah indikator kuantitatif bahan pada waktu t, dan n adalah orde. Bentuk terintegrasi untuk orde nol, pertama dan kedua model kinetik tercantum dalam persamaan (2) dan (3), masing-masing.

$$\text{zero - order} : C_t = C_0 - k \cdot t \tag{2}$$

$$\text{first - order} : \ln \frac{C_t}{C_0} = -k \cdot t \tag{3}$$

dimana C₀ merupakan nilai awal pada waktu nol, C_t adalah nilai pada waktu t, k adalah laju konstan. Persamaan Arrhenius (Persamaan 4) biasanya diterapkan untuk menggambarkan laju reaksi suhu konstan:

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \tag{4}$$

Sebuah plot konstan pada skala semi-logaritmik sebagai fungsi temperatur absolut timbal balik (1/T) harus memberikan garis lurus, dan energi aktivasi ditentukan sebagai kemiringan garis dikalikan dengan konstanta gas (R).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kinetika reaksi oksidasi protein ikan selama penyimpanan dengan menentukan besaran energi aktivasi (E_a) dan konstanta perubahan (k) yang memungkinkan untuk memprediksi tingkat kerusakan karena oksidasi protein ikan berdasarkan persamaan kinetika arrhenius.

METODE PENELITIAN

Bahan Baku

Bahan baku ikan kakap diperoleh dari tempat pelelangan ikan (TPI) Kobong, Kelurahan Kaligawe, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia. Ikan disiangi dan diambil dagingnya, sementara bagian kepala, insang, tulang, dan bagian tubuh lainnya dibuang. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah HCl 0,1 N, NaOH, 0,1 N, KOH 1 N, 2,4 dinitrophenilhidrazil (DNPH), methanol, dan aseton murni dari Merck KgaA (Darmstadt, Jerman).

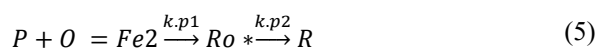
Penyiapan Sampel Protein Ikan

Sebanyak 500 g daging ikan kakap (*Lutjanus sp*) dihomogenkan dengan air dingin sebanyak 3,5 liter. Setelah itu ditambahkan HCl untuk mengekstraksi jumlah protein yang terdapat pada daging ikan. Daging ikan yang telah dihomogenkan diberi HCl dengan pH 2,5 kemudian, disentrifugasi (tahap satu) pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm yang menghasilkan endapan. Endapan kemudian diberi NaOH sampai pH mencapai titik isoelektrik yakni 5,5. Pada pH isoelektrik ini, disentrifugasi (tahap dua) untuk memperoleh endapan yang kedua. Endapan tersebut di-freeze drying selama 3 hari untuk mendapatkan hasil protein ikan atau konsentrat protein ikan.

Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Angka Karbonil

Masing-masing protein ikan sebesar 100 g disimpan pada suhu 0, 10, 20 30, dan 40 °C. Sampel pada penyimpanan suhu 0 °C dilakukan sampling pada hari ke 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, dan 90. Sampel pada penyimpanan suhu 10 °C dilakukan sampling pada hari ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 dan 45. Sampel pada penyimpanan suhu 20 °C dilakukan sampling pada hari ke 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, dan 27. Sampel pada penyimpanan suhu 30 °C dilakukan sampling pada hari ke 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, dan 18. Sampel pada penyimpanan suhu 40 °C dilakukan sampling pada hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9. Sampel dinalisa angka karbonil.

Persamaan Matematik Oksidasi Protein Ikan Kakap (*Lutjanus sp*)



Diketahui bahwa oksidasi protein dapat menghasilkan protein karbonil sebagai akibat dari reaksi oksigen spesies (ROS) yang menghasilkan radikal peroksil, radikal hidroperoksida dan yang selanjutnya, akan menghasilkan radikal alkoksil sebagai pemicu dari Fe²⁺. Hal ini dapat ditunjukkan oleh Persamaan 6, 7, 8, dan 9.

$$(d(P))(dt=)-k.p1[P][O] \quad (6)$$

$$(d(O))(dt=k.p1[P][O]) \quad (7)$$

$$(d(RO^*))(dt=k.p2 [RO^*]) \quad (8)$$

$$(d(R))(dt=k.p2 [R]) \quad (9)$$

Laju reaksi dari semua reaksi ini adalah $k.p_1$ dan $k.p_2$ yang menghasilkan protein karbonil sebagai produk akhir.

Analisis Proksimat

Analisis kimia: proksimat kadar air, kadar abu, protein dan lemak berdasarkan AOAC (2006), Fe menggunakan AAS (Khan dkk., 2009).

Analisis Kadar Protein Karbonil

Ditimbang (0,5 g) protein ikan, diencerkan menjadi 250 ml dengan akuades. Ditambahkan dengan 2,4 dinitrophenilhidrazine dan 1 tetes HCl pekat. Dipanaskan selama 30 menit pada suhu 50 °C dan didinginkan serta ditambahkan lagi 8 ml KOH 1 N. Setelah itu, absorbansi ditera pada panjang gelombang 480 nm (Lappin dan Clark, 1951).

$$\% \text{ kadar karbonil} = \frac{X_{FP}}{\text{mg sampel}} \times 100\% \quad (10)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proksimat Ikan Segar

Berdasarkan Tabel 1 kadar protein ikan kakap segar dalam penelitian ini adalah (18,77%; BB), 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 1. Proksimat, protein ikan dan kadar Fe ikan kakap (*Lutjanus sp*)*

Parameter	Daging segar			Gooch dkk., (2013)
	Kadar (BB)	Kadar (BK)	Protein ikan	
Kadar air (%; BB)	78,39	-	7,20	78,90
Kadar abu (%; BK)	1,58	4,11	1,46	1,10
Protein (%; BK)	18,77	88,92	89,10	19,70
Lemak (%; BK)	1,95	4,81	0,90	1,10
Karbohidrat by difference (%; BK)	0,30	2,16	0,00	0,10
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 mengasilkan isolat, metode isolasi/ekstraksi yang digunakan, homogenisasi daging saat prosesi, rasio ikan dan pelarut (viskositas) yang digunakan, lama ekstraksi, waktu dan suhu prosesi dan kelarutan protein (Shaviklo, 2006).

Tabel 1 menunjukkan pula bahwa 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 sangat tinggi karena kaya hemoprotein (80%) terutama mioglobin dan hemoglobin. Berdasarkan Okada (1990) tersebut, kandungan hemoproteinnya daging ikan kakap rendah sehingga dagingnya berwarna putih. Dengan asumsi Okada (1990), maka secara natural daging ikan kakap daging putih tidak mudah mengalami oksidasi karena sedikitnya prooksidan, walaupun Fe dalam protein ikan masih tinggi (89,96% dari total Fe ikan).

Profil Asam Amino

Tabel 2 terlihat bahwa protein ikan kakap memiliki kandungan asam amino yang rentan terhadap kerusakan oksidatif seperti histidin, alanin, tirosin, metionin, valin, dan phenilalanin. Menurut Konusu dan Yamaguchi (2013); dan Sikorski (2010) bahwa protein ikan mengandung 18 asam amino baik esensial maupun non esensial. Asam-asam amino tersebut antara lain: asam aspartat, asam glutamat, serin, histidin, arginin, glisin, treonin, alanin, tirosin, triptofan,

Tabel 2. Hasil analisis komposisi asam amino protein ikan kakap (*Lutjanus sp*)*

Asam amino	Protein ikan (%)
Asam aspartat (Asp)	21,96
Asam glutamat (Glu)	29,74
Serin (S)	2,17
Glisin (Gly)	3,08
Alanin (Ala)	4,65
Histidin (His)	1,54
Aginin (Arg)	4,72
Tirosin (Tyr)	1,40
Metionin (Met)	1,00
Valin (Val)	1,41
Fenilalanin (Phe)	1,25
Isoleusin (Ile)	1,33
Leusin (Leu)	6,47
Lisin (Lys)	7,45
Treonin (Thr)	0,09

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

sistein, metionin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin, dan lisin.

Berdasar hasil analisis yang dilakukan 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).

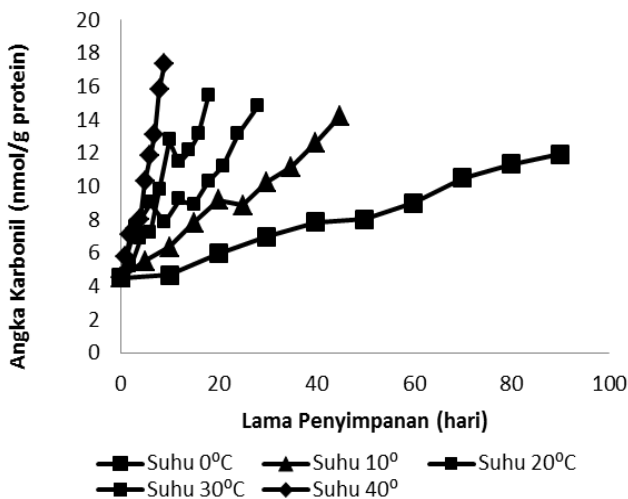
Stadman dan Levine (2003), menyatakan bahwa rantai samping aromatik dari asam-asam amino penyusun protein merupakan target yang potensial dari berbagai senyawa oksigen reaktif seperti fenilalanin, tirosin, triptofan dan histidin. Davies (2005) menyatakan bahwa rantai samping alifatik juga merupakan target utama senyawa oksigen reaktif berupa asam amino leusin, glisin, valin, lisin, prolin, arginin, isoleusin, metionin, dan sistein.

Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Angka Karbonil

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 (Adams dkk., 2001).

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/g sampel.

Peningkatan protein karbonil disebabkan pada protein ikan kakap dalam penelitian ini secara natural masih mengandung besi (Fe) sehingga dapat memicu kerusakan oksidasi. Walaupun dengan asumsi kadar asam lemak dalam



Gambar 1. Oksidasi angka karbonil protein ikan kakap (*Lutjanus sp*) selama penyimpanan

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.

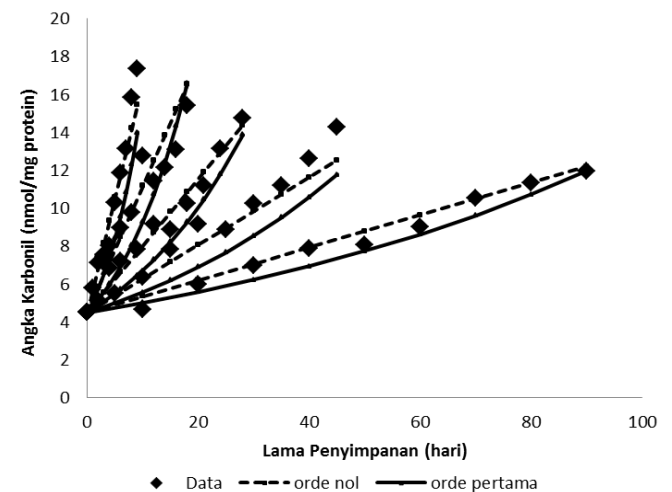
Kinetika Perubahan Angka Karbonil

Nilai k meningkat dengan peningkatan suhu penyimpanan. K meningkat dari 0,0863 menjadi 1,4066 dengan peningkatan suhu dari 0 ke 40 °C (Tabel 3). Konstanta laju (k) perubahan luas (y) menunjukkan nilai perubahan angka karbonil selama penyimpanan.

Besarnya energi aktivasi pembentukan karbonil menurut reaksi orde nol adalah 52,022,26 J/mol.k atau 52,02 KJ/mol.k. Sedangkan reaksi orde pertama adalah 43,364,9 J/mol.k atau 43,37 kJ/mol.k. Prediksi angka karbonil protein ikan kakap menurut reaksi orde nol dan reaksi orde pertama dapat dilihat pada Gambar 2. 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.

Tabel 3. 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	0,5940
40	Y = -1,4066 + 3,8169	0,967	1,4066



Gambar 2. Hubungan antara data (konsentrasi bahan), model reaksi orde nol, dan model reaksi orde pertama pada kadar karbonil protein ikan

Menurut Kjarsgard dkk. (2006) dan Baron dkk. (2007) dengan adanya kenaikan suhu dan lama penyimpanan menyebabkan protein karbonil meningkat. Adams dkk. (2001) serangan radikal hidroksil yang dihasilkan dari degradasi H₂O₂ dengan kehadiran Fe²⁺ atau Cu²⁺ mengakibatkan terjadinya kerusakan protein yang ditandai dengan terbentuknya protein karbonil.

KESIMPULAN

Angka karbonil meningkat 4,3 kali pada suhu 0 °C 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/g sampel. Energi aktivasi yang dibutuhkan dalam reaksi oksidasi protein ikan pada reaksi orde nol selama penyimpanan adalah 42,015 kJ/mol.K. Kinetika pembentukan kadar karbonil pada orde reaksi pertama adalah 34818,9 j/mol.k atau 34,818 kJ/mol.k yang memperlihatkan laju pembentukan kadar karbonil lambat atau reaksi yang berlangsung adalah reaksi orde pertama. Dengan adanya kenaikan suhu dan lama penyimpanan menyebabkan protein karbonil meningkat dan serangan radikal hidroksil yang dihasilkan dari degradasi H₂O₂ dan kehadiran Fe²⁺ atau Cu²⁺ mengakibatkan terjadinya kerusakan protein yang ditandai dengan terbentuknya protein karbonil.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, S., Green, P., Claxton, R., Simcox., Williams, M.V. dan Walsh, K. (2001). Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in Bioscience* **6**: 17-24.
- AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. Association of Official Analytical Chemistry Washington, DC.
- Baron, P.C., Kjaesgrad, I.V.H., Jessen, F. dan Jacobsen, C. (2007). Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8118-8125.
- Davies, M.J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochemica et Biophysica Acta* **1703**: 93-109.
- El-Faer, M.Z., Rawdah, T.N., Attar, K.M. dan Arab, M. (2012). Mineral and proximate composition of some commercially important fish of the arabian gulf. *Food Chemistry* **45**: 95-98.
- Gooch, J.A., Hale, M.B., Brown, T.Jr., Bonnet, J.C., Brand, C.G. dan 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*.
- Khan, Z.I., Ashraf, M., Ahmad, K., Valeem, E.E dan Mcdowell, L.R., (2009). Mineral status of forage and its relationship with that of plasma farm animals in southern Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition* **41**: 67-72.
- Kjaersgard, I.V.H., Norrelykke, M.R., Baron, C.P. dan Jessen, F. (2006). Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **54**: 9437-9446.
- Konusu, S. dan Yamaguchi, K. (2013). *The Flavor Components in Fish and Shellfish*. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Product. *The AVI Publishing Company. Inc. Westport. Conn*cut.
- Labuza, T.P. dan Riboh, D. (1982). Theory and application of kinetics to the prediction of nutrient losses in food. *Food Technology* **7**: 66-74.
- Lappin, G.R. dan Clark, L.C. (1951). Colorimetric methods for determination of trace carbonyl compound. *Analytical Chemistry* **23**: 541-542.
- Mercier, P., Gatelier, P., Vincent, A. dan Renerre (2011). Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Science* **58**: 125-134.
- Nurnadia, A.A., Azrina, A. dan 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.
- Shaviklo, G.R. (2006). *Quality Assessment of Ash Protein Isolates using Surim Standard Methods*. Reykjavik, Ice/ and: The United Nations University.
- Sikorski, Z.E. (2010). *Seafood: Resource, Nutritional Composition and Preservation*. CRC Press Inc., Boca Rotan Florida. P:39.
- Stadman, E.R. dan Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation free amino acids residues in proteins. *Amino Acids* **25**: 207-218.

- Theodore, L., Brown, H., LeMay, E. dan Bursten, B.E. (2000). Chemistry: The Central Science, 8th Edition. Prentice Hall College Div.
- Tokur, B. dan Korkmaz, K. (2007). The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chemistry* **104**: 754-760.
- Vareltzis, P., Hultin, H.O. dan 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. dan 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.
- Yan, L.J., Levine, R.L. dan Sohal, R.S. (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Journal Process Natlantic Academic Science USA* **94**: 11168-11172.