

INHIBITOR KATEPSIN ALAMI UNTUK MENGHAMBAT KEMUNDURAN MUTU IKAN BANDENG SELAMA PENYIMPANAN SUHU DINGIN

NATURAL CATHEPSIN INHIBITOR TO INHIBIT MILKFISH DETERIORATION DURING CHILLING STORAGE

Tati Nurhayati^{1*}, Wini Trilaksani¹, dan Mohammad Zaenuri¹

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK-IPB, Bogor

*E-mail: nurhayati7870@yahoo.com

ABSTRACT

Quality deterioration of fish is caused by various factors, one of them is due to the activity of cathepsin enzyme. Cathepsin enzyme activity can be inhibited by enzyme inhibitors. Inhibitors of the enzyme can be obtained from fish meat tissue by separating the enzyme-inhibitor complex with heat treatment. The purpose of this research was to extract and apply the cathepsin inhibitors to inhibit deterioration of fish quality. This research was conducted in three steps: (1) the determination of the optimum extraction temperature for extraction of cathepsin inhibitors, (2) the determination of the most potent cathepsin inhibitors with various concentrations, and (3) the application of cathepsin inhibitors in inhibiting the deterioration of fish quality. The results showed that the cathepsin inhibitors was optimally extracted at 80°C. Cathepsin inhibitors diluted using buffer with a ratio of 1:1 had the same relative activity without dilution. The process of quality deterioration of milkfish control in chilling temperatures occurred after 504 hours (21 days) storage with a 24-hour observation time interval. The complete process during observation was pre-rigor (0 hour), rigor mortis (96 hours), post-rigor (360 hours), and deterioration (504 hours). The process of milkfish quality deterioration treated with soaking in cathepsin inhibitors occurred after 624 hours (26 days) storage with the detailed process as follows: 0 hour (pre-rigor), 144 hours (rigor mortis), 408 hours (post-rigor), and 624 hours (deterioration). Thus fish marinated with cathepsin inhibitors achieve slower deterioration phase 5 days.

Keywords: cathepsin inhibitor, deterioration, pre-rigor, rigor mortis, post-rigor, quality deterioration.

ABSTRAK

Kemunduran mutu ikan disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah akibat aktivitas enzim katepsin. Aktivitas enzim katepsin dapat dihambat dengan inhibitor enzim. Inhibitor enzim dapat diperoleh dari jaringan daging ikan dengan cara memisahkan kompleks enzim-inhibitor dengan perlakuan pemanasan. Tujuan penelitian ini adalah mengekstrak dan mengaplikasikan inhibitor katepsin untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu (1) penentuan suhu optimum ekstraksi inhibitor katepsin, (2) penentuan daya hambat tertinggi berbagai konsentrasi inhibitor katepsin, dan (3) aplikasi inhibitor katepsin dalam menghambat kemunduran mutu ikan bandeng. Hasil penelitian menunjukkan bahwa inhibitor katepsin dapat diekstrak dengan baik menggunakan suhu 80°C. Inhibitor katepsin yang diencerkan menggunakan bufer dengan perbandingan 1:1 memiliki aktivitas yang relatif sama dengan tanpa pengenceran. Proses kemunduran mutu pada ikan bandeng kontrol dalam penyimpanan suhu *chilling* terjadi selama 504 jam (21 hari) dengan interval waktu pengamatan 24 jam berturut-turut yaitu 0 jam (*pre rigor*), 96 jam (*rigor mortis*), 360 jam (*post rigor*), dan 504 jam (busuk). Proses kemunduran mutu ikan bandeng dengan perlakuan perendaman inhibitor katepsin terjadi selama 624 jam (26 hari) dengan proses sebagai berikut: 0 jam (*pre rigor*), 144 jam (*rigor mortis*), 408 jam (*post rigor*), dan 624 jam (busuk). Dengan demikian ikan bandeng yang direndam dengan inhibitor katepsin mencapai fase deteriorasi lebih lambat 5 hari.

Kata kunci: inhibitor katepsin, kemunduran mutu, *pre rigor*, *rigor mortis*, *post rigor*, deteriorasi

I. PENDAHULUAN

Proses kemunduran mutu ikan disebabkan oleh adanya aktivitas enzim terutama enzim proteolitik yang secara alami terdapat dalam ikan. Enzim tersebut bekerja menguraikan protein menjadi pepton, peptida, dan asam amino. Proses hidrolisis protein oleh suatu protease misalnya katepsin, kalpain dan kolagenase, mengakibatkan akumulasi metabolit, perubahan cita rasa dan pelunakan tekstur, terbentuknya komponen volatil, serta tersedianya asam amino sebagai sumber makanan bakteri, yang akhirnya menimbulkan kebusukan (Huss, 1995).

Diantara ketiga jenis protease yang terlibat dalam kemunduran mutu ikan, katepsin merupakan enzim yang paling bertanggung jawab terhadap kemunduran mutu ikan (Huss, 1995). Katepsin ditemukan di lisosom serat daging dan di sel fagosit. Lisosom merupakan organel intraseluler yang banyak mengandung enzim hidrolitik dan berperan dalam pencernaan dalam sel. Beberapa tipe katepsin telah diidentifikasi dengan asam amino yang berbeda di sisi aktifnya. Katepsin B (EC 3.4.22.2) dan katepsin L (EC 3.4.22.15) keduanya merupakan sistein proteinase yang kemungkinan paling penting dalam kemunduran tekstur daging. Aktivitasnya berbeda-beda pada tiap fraksi daging dan spesies ikan. Aktivitas optimum dilaporkan pada suhu 40-50°C dan aktivitasnya menurun dengan penurunan suhu. Katepsin secara umum bekerja pada pH 3-4 dan beberapa katepsin juga mempunyai aktivitas tinggi pada pH 6-6,5 (Kolodziejska and Sikorski, 1996; Aoki *et al.*, 2000).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang erat antara aktifnya enzim katepsin dengan laju kemunduran mutu ikan, baik pada bagian daging ikan (Salamah *et al.*, 2010), jeroan ikan (Nurhayati *et al.*, 2010^a), maupun kulit ikan (Nurhayati *et al.*, 2010^b). Enzim tersebut tidak aktif pada saat ikan dalam kondisi segar (fase *pre-rigor*) karena pada kondisi tersebut inhibitor katepsin bekerja untuk menghambat

kerja enzim katepsin. Ketika ikan memasuki fase *rigor mortis* aktivitas enzim katepsin meningkat dan menjadi sangat aktif ketika ikan berada pada fase awal *post rigor*. Pada kondisi ini inhibitor katepsin mengalami denaturasi akibat pH yang rendah sehingga tidak bisa menghambat kerja enzim katepsin. pH rendah merupakan pH optimum untuk aktivitas enzim katepsin (Huss, 1995).

Salah satu cara untuk menghambat kemunduran mutu ikan adalah dengan menghambat kerja enzim proteolitik menggunakan senyawa inhibitor alami termasuk yang berasal dari kulit ikan patin. Inhibitor katepsin diekstrak dengan baik pada saat ikan berada pada awal kematian atau fase *pre rigor* (Nurhayati *et al.*, 2013^b). Hasil penelitian yang telah dilakukan (Nurhayati *et al.*, 2013^a) menunjukkan bahwa bagian daging ikan patin (*Pangasianodon hypophthalmus*) mengandung inhibitor katepsin. Nurhayati *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa inhibitor katepsin alami dapat diaplikasikan pada ikan dari jenis yang berbeda dengan asal inhibitornya. Informasi yang didapat dari penelitian tersebut memerlukan kajian lebih lanjut, oleh karena itu penelitian tentang penggunaan inhibitor katepsin dari daging ikan bandeng untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng penting untuk dilakukan.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging ikan bandeng (*Chanos chanos*) yang diperoleh dari ikan bandeng ukuran konsumsi (200 g/ekor) fase *pre-rigor* sebagai sumber inhibitor enzim katepsin dan ikan bandeng hidup dengan ukuran yang sama. Bahan-bahan untuk analisis pH (larutan buffer standar pH 4 dan pH 7, akuades), analisis *total plate count* (TPC) (larutan garam 0,85% steril, *nutrient agar*), analisis *total volatile bases* (TVB) (H₃BO₃, K₂CO₃, *trichloroacetic acid* (TCA) 7%, HCl 0,01 N).

Bahan-bahan untuk ekstraksi enzim katepsin adalah buffer tris HCl (pH 7,4),

assay aktivitas enzim katepsin (hemoglobin, tirosin, akuades, TCA 5%, pereaksi folin) dan pengukuran konsentrasi protein enzim *bovine serum albumin* (BSA), *coomasie brilliant blue G-250*, etanol 95% (v/v), asam fosfat 85% (w/v), dan akuades. Bahan-bahan untuk ekstraksi inhibitor katepsin adalah akuades, sodium fosfat dan asam sitrat.

Alat-alat yang digunakan, yaitu refrigerator (LG), inkubator (Termolina), oven (Yammato), sentrifuse Sorvall, spektrofotometer (Yamato), mikropipet (Pipetman), timbangan analitik, *homogenizer*, *magnetic stirrer*, dan *hot plate*.

2.2. Ekstraksi Inhibitor Katepsin dari Daging Ikan Bandeng

Ekstraksi inhibitor katepsin dilakukan pada berbagai suhu inkubasi dengan tujuan untuk mendapatkan suhu optimum ekstraksi inhibitor katepsin dari daging ikan. Proses ekstraksi ini dilakukan pada saat ikan dalam kondisi *pre rigor* dengan metode (An *et al.*, 1995). Tahap ekstraksi inhibitor enzim katepsin dilakukan sebagai berikut: ikan bandeng hidup ditusuk bagian medula oblongata, lalu diambil bagian daging. Daging tersebut dicincang sampai halus dan dihomogenisasikan pada suhu 0-4°C lalu disentrifugasi pada 5.000 g selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambah sebanyak volume yang sama dengan buffer McIlvaine (0,2 M sodium fosfat dan 0,1 M sitrat), pH buffer 5,5. Campuran ini dipanaskan pada berbagai suhu inkubasi yaitu 60°C, 70°C, 80°C dan 90°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada 7.000 g selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar inhibitor enzim katepsin. Aktivitas inhibitor enzim katepsin diukur menggunakan metode Dinu *et al.* (2002).

2.3. Penentuan Konsentrasi Inhibitor Katepsin yang Tepat untuk Diaplikasikan dalam Menghambat Kemunduran Mutu Ikan Bandeng

Ekstrak inhibitor katepsin yang diperoleh diencerkan pada beberapa konsentrasi

guna mendapatkan konsentrasi yang tepat untuk diaplikasikan. Konsentrasi yang diberikan merupakan perbandingan antara inhibitor dengan buffer McIlvaine (0,2 M sodium fosfat dan 0,1 M sitrat) yaitu (1:0, 1:1, 1:2 dan 1:3). Masing-masing konsentrasi diukur aktivitas penghambatan dan konsentrasi proteinnya menggunakan metode Dinu *et al.* (2002) dan Bradford (1976).

2.4. Aplikasi Inhibitor Katepsin dalam Menghambat Kemunduran Mutu

Ekstrak inhibitor katepsin dengan konsentrasi yang tepat digunakan dalam aplikasi untuk mutu ikan bandeng. Tahap ini bertujuan untuk menganalisis tingkat kesegaran ikan bandeng yang telah direndam dalam larutan inhibitor. Ikan bandeng hidup ditusuk bagian medula oblongata. Ikan yang sudah disiangi dan dicuci bersih direndam dalam larutan inhibitor katepsin selama 1 jam. Ikan bandeng tersebut disimpan pada suhu *chilling* ($\pm 1,1^\circ\text{C}$) selama 26 hari dengan pengamatan pada setiap fase *post mortem*. Analisis tingkat kesegaran ikan pada tahap aplikasi ini meliputi penilaian organoleptik menggunakan *score sheet* berdasarkan SNI 01-2346-2006 (Badan Standardisasi Nasional, 2006), penentuan nilai pH (Lopez-Caballero *et al.*, 2006), analisis *total volatile bases* (TVB) (Lopez-Caballero *et al.*, 2006), serta jumlah total bakteri dengan metode TPC (Lopez-Caballero *et al.*, 2006).

2.5. Pengujian Inhibitor Katepsin (Dinu *et al.*, 2002)

Uji ini ditentukan dengan mengukur derajat penghambatan dari aktivitas enzim katepsin menggunakan substrat hemoglobin. Uji ini dimulai dengan mereaksikan ekstrak inhibitor 0,1 mL dengan katepsin 0,1 mL selama 30 menit pada suhu inkubasi 37°C. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL dari larutan substrat hemoglobin 2% (w/v) dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL TCA 5% (w/v). Campuran disaring dan hasil reaksi ditambah dengan 1 mL pereaksi folin,

kemudian campuran diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=750$ nm.

Pengukuran ini dilakukan bersamaan dengan pengukuran larutan blanko dan larutan standar dengan prosedur yang sama seperti larutan sampel hanya untuk larutan blanko larutan campuran enzim digantikan dengan enzim digantikan dengan akuades dan untuk larutan standar larutan campuran enzim digantikan dengan tirosin. Bersamaan dengan itu juga diperlukan uji aktivitas katepsin tanpa penambahan inhibitor dengan menggunakan enzim katepsin sebanyak 0,1 mL. Aktivitas inhibitor dihitung berdasarkan perbedaan aktivitas enzim katepsin yang ditambah dengan inhibitor dan yang tanpa inhibitor. Aktivitas enzim katepsin dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$UA = \frac{(\text{Abs.sampel} - \text{abs.blanko})}{(\text{Abs.standar} - \text{abs.blanko})} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan: UA/mL= jumlah tirosin yang dihasilkan per ml enzim per menit, P = faktor pengenceran, T= waktu inkubasi (10 menit) Persentase penghambatan:

$$\left(1 - \frac{(\text{aktivitas katepsin dengan inhibitor})}{(\text{aktivitas katepsin tanpa inhibitor})}\right) \times 100\%$$

Satu unit inhibitor katepsin adalah jumlah inhibitor katepsin yang mampu menghambat aktivitas protease katepsin sebesar 50% pada kondisi pengujian.

2.6. Uji Organoleptik (Badan Standardisasi Nasional, 2006)

Metode yang digunakan untuk uji organoleptik adalah dengan *score sheet* berdasarkan SNI 01-2346-2006. Pengujian organoleptik merupakan cara pengujian yang bersifat obyektif menggunakan indera yang ditunjukkan pada mata, insang, lendir permukaan badan, daging, bau, dan tekstur. Pada uji organoleptik ini ada beberapa syarat yang harus dipenuhi oleh panelis (SNI 01-2346-2006), antara lain tertarik dan mau berpartisipasi dalam uji organoleptik, terampil dan

konsisten dalam mengambil keputusan, siap sedia pada saat dibutuhkan dalam pengujian, tidak menolak contoh yang akan diuji, berbadan sehat, bebas dari penyakit THT dan tidak buta warna (psikologis), tidak merokok, serta jumlah panelis minimum untuk satu kali pengujian adalah 15 orang (panelis semi terlatih). Dari data yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis kesegaran ikan dengan kriteria sebagai berikut: segar = nilai organoleptik berkisar antara 7-9, agak segar= nilai organoleptik berkisar antara 5-6, dan tidak segar= nilai organoleptik berkisar antara 1-3.

2.7. Penentuan Nilai pH (Lopez-Caballero *et al.*, 2006)

Analisis derajat keasaman (pH) ditentukan menggunakan pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi terlebih dahulu. pH meter dinyalakan dan dibiarkan stabil selama 15-20 menit, kemudian elektroda dibilas dengan larutan buffer atau akuades. Bila menggunakan akuades, elektroda dikeringkan dengan kertas tissue. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan buffer dan didiamkan beberapa saat hingga diperoleh pembacaan yang stabil. Angka pH meter disesuaikan dengan pH buffer, yaitu buffer pH 4 dan buffer pH 7. Sampel sebanyak 10 gram yang diambil dari bagian daging dinding perut ikan dihancurkan dan dihomogenkan dengan 90 mL air destilat, lalu diukur dengan pH meter yang telah dikalibrasi.

2.8. Uji TPC (Lopez-Caballero *et al.*, 2006)

Prinsip kerja analisis TPC adalah perhitungan jumlah bakteri yang ada di dalam sampel (daging ikan) dengan pengenceran sesuai keperluan dan dilakukan secara duplo. Pembuatan larutan contoh dilakukan dengan mencampurkan 10 g sampel yang telah dihancurkan yang diambil dari daging ikan, lalu dimasukkan ke dalam botol yang berisi 90 mL larutan garam 0,85% steril, kemudian dikocok sampai larutan homogen. Campuran larutan contoh tersebut diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol berisi 9 mL larutan garam 0,85% steril sehingga diperoleh con-

toh dengan pengenceran 10^{-2} , setelah itu dikocok agar homogen. Banyaknya pengenceran dilakukan sesuai dengan keperluan penelitian, biasanya sampai pengenceran 10^{-5} . Pipet diambil dari masing-masing tabung pengenceran sebanyak 1 mL larutan contoh dan dipindahkan ke dalam cawan petri steril secara duplo menggunakan pipet steril. Media agar dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL dan digoyangkan sampai permukaan agar merata (metode tuang), kemudian dibiarkan beberapa saat hingga dingin dan mengeras. Cawan petri yang telah berisi agar dan larutan contoh dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 30°C selama 48 jam dengan posisi cawan petri yang dibalik. Selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah koloni yang ada didalam cawan petri tersebut. Jumlah koloni bakteri yang dihitung adalah cawan petri yang mempunyai koloni bakteri 30-300 koloni.

2.9. Uji TVB (Lopez-Caballero et al., 2006)

Prinsip dari analisis TVB adalah menguapkan senyawa-senyawa basa volatil (amin, mono-, di-, dan trimetilamin). Senyawa tersebut kemudian diikat oleh asam borat dan kemudian dititrasi dengan larutan HCl.

Preparasi sampel dilakukan dengan cara menimbang 15 g sampel yang diambil dari daging ikan, kemudian ditambahkan 45 ml TCA 7% dan dihomogenkan selama 1 menit. Hasil homogenisasi kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat yang berwarna jernih. Setelah penyiapan sampel maka dilakukan uji TVB dengan cara memasukkan 1 mL H_3BO_3 ke dalam *inner chamber* cawan Conway dan tutup cawan diletakkan dengan posisi hampir menutupi cawan. Dengan memakai pipet 1 mL yang lain, filtrat dimasukkan ke dalam *outer chamber* disebelah kiri. Kemudian 1 mL larutan K_2CO_3 jenuh ditambahkan kedalam *outer chamber* sebelah kanan sehingga filtrat dan K_2CO_3 tidak tercampur. Cawan segera ditutup dengan sebelumnya pinggir cawan diolesi vaselin agar proses penutupan sempurna, lalu dige-

rakkan memutar sehingga kedua cairan di *outer chamber* tercampur. Disamping itu dikerjakan blanko dengan prosedur yang sama tetapi filtrat diganti dengan TCA 7%. Kemudian kedua cawan Conway tersebut diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, larutan asam borat dalam *inner chamber* cawan Conway yang berisi blanko dititrasi dengan larutan HCl 0,01 N dan cawan digoyang-goyangkan sampai larutan asam borat berubah warna menjadi merah muda. Selanjutnya cawan Conway yang berisi sampel juga dititrasi dengan larutan yang sama dengan blanko. Kadar TVB dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\%N(\text{mg n}/100\text{g}) = \frac{(j - i) \times \text{NHCl} \times 100 \times \text{fp} \times 14 \times \text{mg N}/100}{\text{g contoh} \times 1}$$

keterangan: j = ml titrasi sampel, fp = faktor pengenceran, i = ml titrasi blanko, N = normalitas HCl (0,01 N).

2.10. Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian pendahuluan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu perlakuan yaitu pengenceran inhibitor pada berbagai konsentrasi (1:0, 1:1, 1:2, dan 1:3) dengan dua kali ulangan.

Model linear untuk rancangan acak lengkap yang digunakan adalah sebagai berikut (Mattjik dan Sumertajaya, 2002):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \dots \dots \dots (1)$$

$$i = \text{faktor } (i = 1,2,3,4) \dots \dots \dots (2)$$

$$j = \text{ulangan } (j = 1,2) \dots \dots \dots (3)$$

keterangan:

Y_{ij} = respon percobaan karena pengaruh berbagai suhu inkubasi/pengenceran pada faktor ke-i dan ulangan ke-j

μ = rata-rata umum

τ_i = pengaruh faktor perlakuan (berbagai suhu inkubasi/pengenceran) pada taraf ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan karena faktor berbagai suhu inkubasi/pengenceran pada taraf ke-i dan ulangan ke-j.

Hipotesis:

H0= semua perlakuan memberikan pengaruh yang sama terhadap aktivitas inhibisi

H1= semua perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas inhibisi

Data parametrik dianalisis secara statistik dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Jika hasil analisis menunjukkan berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

Adapun perhitungan untuk uji lanjut Duncan sebagai berikut:

$$s_y = \sqrt{\frac{KTG}{r}} \quad R_p = r_p (S_y)$$

keterangan: KTG= nilai kuadrat tengah galat; r = jumlah ulangan; r_p = ditentukan dari tabel.

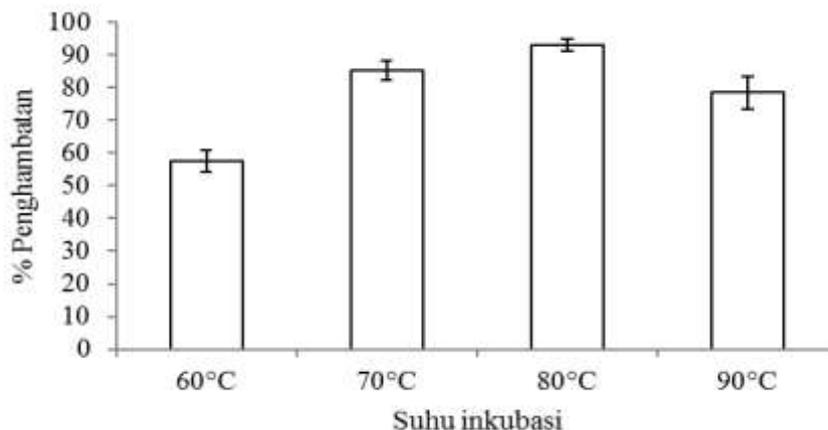
Analisis data yang digunakan dalam penelitian lanjutan ialah menggunakan analisis deskriptif dengan membandingkan antara ikan perlakuan perendaman inhibitor dan ikan kontrol (tanpa perendaman inhibitor) menggunakan microsoft excel 2007.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Ekstraksi Inhibitor Katepsin

Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa aktivitas inhibisi semakin meningkat dari

suhu 60°C sampai dengan suhu 80°C dan turun kembali pada suhu 90°C. Berdasarkan uji statistik, suhu inkubasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas inhibisi (Sig.<0,05) sehingga dilakukan uji lanjut untuk melihat adanya perbedaan pengaruh masing-masing suhu terhadap aktivitas inhibisi. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa suhu inkubasi terbaik adalah 80°C dengan aktivitas inhibisi sebesar 93,06%. Dengan demikian maka ditetapkan bahwa suhu inkubasi terbaik adalah 80°C dengan aktivitas inhibisi sebesar 93,06%. Hasil yang sama ditunjukkan oleh hasil penelitian Nurhayati *et al.* (2013^b) yang menunjukkan bahwa inhibitor enzim katepsin dari daging ikan patin dapat diekstrak dengan efektif pada suhu inkubasi 80°C. Nurhayati *et al.* (2013^a) juga melaporkan bahwa inhibitor katepsin dari kulit ikan patin juga dapat diekstrak dengan baik menggunakan suhu 80°C. Penelitian Ylonen *et al.* (1999) dalam Li *et al.* (2008) menyatakan bahwa pada suhu 80°C, inhibitor protease jenis sistein dari ikan salmon atlantik mempunyai aktivitas inhibisi yang lebih stabil. Menurut Jiang (2000), pada suhu 60-70°C terjadi aktivasi enzim katepsin, sedangkan pada suhu 80°C aktivitas enzim telah menurun sehingga penghambatan yang efektif terjadi apabila suhu inkubasi telah mencapai 80°C.



Gambar 1. Hasil aktivitas inhibitor katepsin pada berbagai suhu inkubasi.

3.2. Penentuan Daya Hambat Tertinggi Berbagai Konsentrasi Inhibitor Katepsin

Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa semakin besar konsentrasi pengenceran, aktivitas penghambatan terhadap enzim katepsin semakin kecil. Berdasarkan uji statistik, faktor pengenceran memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas inhibisi (Sig.<0,05) sehingga dilakukan uji lanjut untuk melihat adanya perbedaan pengaruh masing-masing faktor pengenceran terhadap aktivitas inhibisi. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa faktor pengenceran 1:1 merupakan faktor pengenceran yang terbaik dibandingkan dengan faktor pengenceran 1:2 dan 1:3 sehingga digunakan untuk aplikasi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar faktor pengenceran, semakin kecil konsentrasi protein inhibitorynya sehingga aktivitas penghambatan akan berkurang.

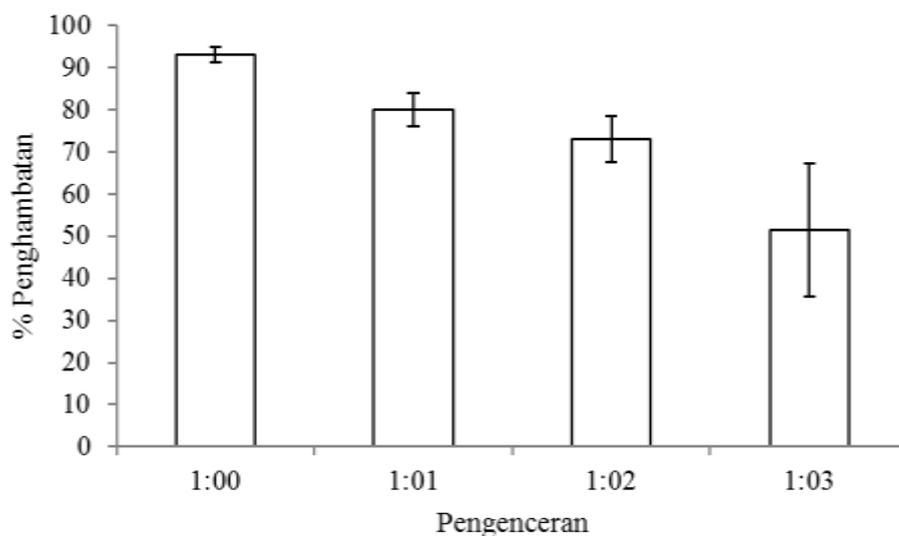
Menurut Apriyanti (2007) jenis inhibitor dan konsentrasi inhibitor merupakan faktor yang paling berperan dalam mempengaruhi besar kecilnya presentase penghambatan enzim katepsin. Inhibitor kimia (pepstatin) dengan konsentrasi 1 μ M mampu menghambat aktivitas enzim katepsin dari daging ikan nila sebesar 76,79% dan pada

konsentrasi 5 μ M mampu menghambat aktivitas enzim katepsin sebesar 92,71%, lebih besar daripada inhibitor kimia yang lain seperti EDTA dan PMSF pada konsentrasi yang sama.

3.3. Aplikasi Inhibitor Katepsin dalam Menghambat Kemunduran Mutu

3.3.1. Penentuan Tahap *Post Mortem* Ikan Bandeng yang disimpan pada Suhu *Chilling*

Pengamatan kondisi *post mortem* ikan dilakukan dari fase *pre rigor* sampai kebusukan. Tabel 1 menunjukkan fase *mortem* ikan bandeng yang disimpan pada suhu *chilling*. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa ikan bandeng yang disimpan pada suhu *chilling* setelah sebelumnya direndam terlebih dahulu dalam inhibitor katepsin memasuki fase *rigor mortis* dan *post rigor* awal yang lebih lambat 48 jam, dan selanjutnya memasuki fase kebusukan yang lebih lambat 120 jam. Ini berarti bahwa inhibitor katepsin dapat berfungsi untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng. Hasil penelitian Nurhayati *et al.* (2011) menunjukkan bahwa ikan bandeng yang sebelum disimpan pada suhu *chilling* direndam terlebih dahulu dengan larutan inhibitor katepsin yang



Gambar 2. Perbandingan aktivitas inhibitor katepsin pada berbagai pengenceran.

Tabel 1. Fase *post mortem* ikan bandeng yang disimpan pada suhu chilling.

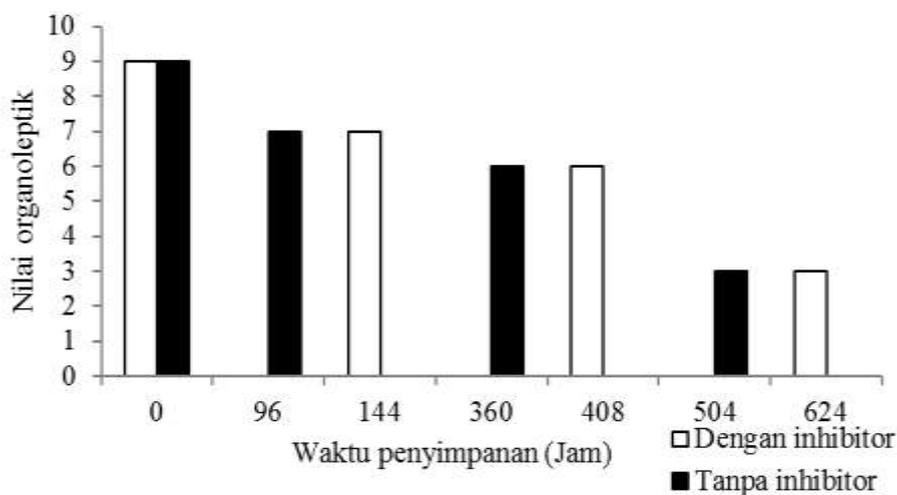
Fase post mortem	Perlakuan sebelum disimpan pada suhu <i>chilling</i>	
	Direndam dalam bufer tanpa inhibitor katepsin (kontrol)	Direndam dalam larutan inhibitor katepsin (perlakuan)
Pre rigor awal	0 jam	0 jam
Rigor mortis awal	96 jam	144 jam
Post rigor awal	360 jam	408 jam
Deteriorasi awal	504 jam	624 jam

diekstrak dari daging ikan patin mampu dihambat kemunduran mutunya hingga 72 jam (3 hari).

3.3.2. Nilai Organoleptik Ikan Bandeng yang Disimpan Pada Suhu *Chilling*

Ikan yang disimpan pada suhu *chilling* akan mengalami kemunduran mutu. Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai organoleptik ikan bandeng kontrol dan perlakuan mengalami penurunan selama penyimpanan pada suhu *chilling*, namun nilai organoleptik ikan bandeng kontrol lebih cepat mengalami penurunan dibandingkan perlakuan. Ikan bandeng memiliki nilai organoleptik 9 saat fase *pre rigor* yang berarti bahwa menurut SNI 01-2346-2006 ikan masih berada pada kondisi sangat segar. Nilai organoleptik turun menjadi 7 saat memasuki fase *rigor mortis* yang berarti bahwa ikan berada pada kondisi

segar. Penurunan nilai organoleptik terus berlanjut selama penyimpanan. Nilai organoleptik turun menjadi 6 ketika memasuki fase *post rigor* yang berarti bahwa ikan berada pada ambang batas diterima. Fase deteriorasi dicapai ketika nilai organoleptik mencapai nilai 3. Penurunan nilai organoleptik yang lebih lambat pada ikan bandeng perlakuan disebabkan oleh adanya pengaruh inhibitor yang masuk ke dalam daging ikan melalui pori-pori kulit sehingga dapat menghambat aktivitas enzim katepsin dalam menguraikan protein menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino. Akibatnya, kemunduran mutu ikan menjadi terhambat lebih lama. Nurhayati *et al.* (2011) melaporkan bahwa penurunan nilai organoleptik yang lebih lambat pada ikan bandeng perlakuan juga terjadi pada ikan bandeng yang direndam terlebih dahulu dengan larutan inhibitor katepsin yang diekstrak dari daging ikan patin.



Gambar 3. Nilai organoleptik ikan bandeng selama penyimpanan pada suhu *chilling*.

3.3.3. Nilai pH

Nilai pH merupakan salah satu indikator pengukuran tingkat kesegaran mutu ikan. Nilai pH daging ikan ketika masih hidup umumnya mempunyai pH netral dan setelah mati pH menjadi turun (Eskin *et al.*, 1990). Hasil pengukuran nilai pH daging ikan bandeng kontrol dan perlakuan selama penyimpanan suhu *chilling* disajikan pada Gambar 9. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan bandeng yang berada pada fase *pre rigor* memiliki pH mendekati netral yaitu 6,21 (kontrol) dan 6,33 (perlakuan).

Nilai pH akan semakin menurun seiring semakin banyaknya asam laktat yang terbentuk dan penurunan ATP. Pada akhirnya pH akan semakin asam, yaitu pada fase *rigor mortis*. Nilai pH dari daging ikan bandeng pada fase *rigor mortis* berkisar antara 6 hingga 6,06 dengan lama waktu penyimpanan 96 jam (kontrol) dan 144 jam (perlakuan). Penelitian Church (1998) diacu dalam Ladrat (2006) menunjukkan bahwa pH ikan mengalami penurunan pada fase *rigor mortis* dari 7,4 menjadi 6 dan kadang-kadang dibawahnya. Perubahan pada fase ini merupakan akibat dari suatu rangkaian kimiawi yang kompleks di dalam otot ikan sesudah kematiannya.

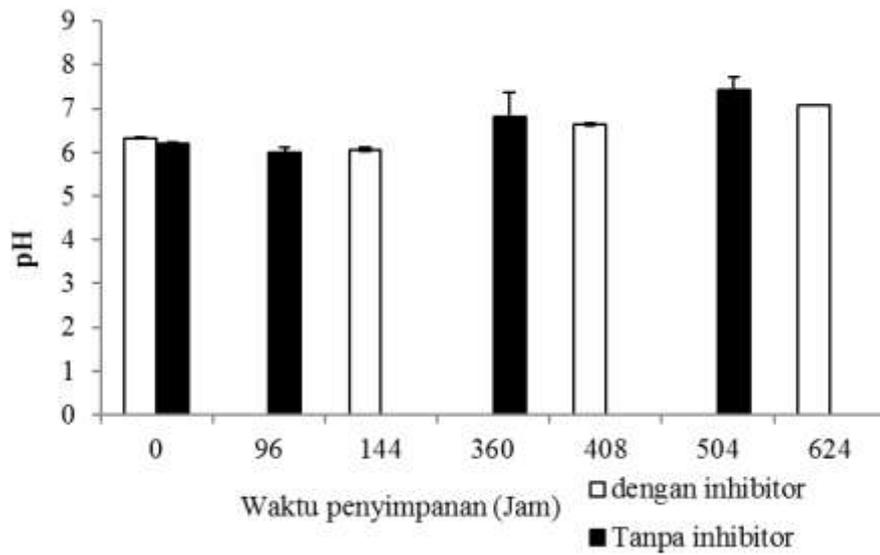
pH yang terus menurun menyebabkan enzim katepsin semakin aktif karena pH menjadi lebih asam. Aktivitas enzim katepsin akan memberikan pengaruh yang signifikan jika nilai pH rendah (Taylor *et al.*, 1995). Macam-macam enzim katepsin yang aktif dalam fase ini antara lain katepsin B, D, H dan L. Enzim-enzim tersebut diatur oleh inhibitor protease yang disebut cystatin (Turk dan Bode 1991 diacu dalam Chereta 2007) dan juga pepstatin (Dinu *et al.*, 2002). Akibat kerja katepsin akan terbentuk turunan-turunan protein berupa peptida, asam amino, bahkan bisa terbentuk turunan asam amino yang bersifat basa sehingga pH ikan kembali naik dan tekstur daging ikan menjadi lunak (Jiang, 2000). Kondisi ini menunjukkan fase *post rigor*. Ikan bandeng kontrol memasuki

fase *post rigor* setelah penyimpanan 360 jam (kontrol) dan 408 jam (perlakuan). Nilai pH daging ikan bandeng pada fase tersebut berkisar antara 6,65-6,82. Selanjutnya pH terus naik akibat semakin banyak basa volatil yang terbentuk setelah penyimpanan 504 jam (kontrol) dan 624 jam (perlakuan). Menurut Taskaya *et al.* (2003), peningkatan nilai pH tergantung dari lama waktu penyimpanan, suhu penyimpanan, kondisi fisiologis, kandungan protein, dan aktivitas enzim.

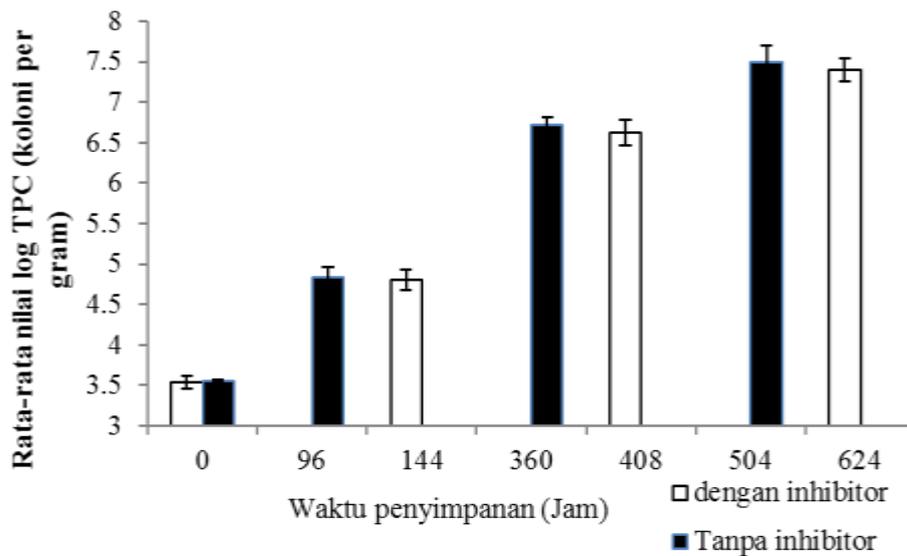
Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 4) dapat diketahui bahwa pH ikan bandeng perlakuan mengalami penurunan pH yang lebih lambat dibandingkan kontrol, yaitu saat memasuki fase *rigor mortis*, kemudian terjadi kenaikan pH yang lebih lambat dibandingkan kontrol saat memasuki fase *post rigor* dan deteriorasi. Hal ini menunjukkan bahwa larutan inhibitor katepsin yang digunakan untuk merendam ikan bandeng efektif untuk menghambat aktivitas enzim katepsin sehingga laju kemunduran mutu menjadi terhambat pula.

3.3.4. Nilai TPC

Hasil penelitian (Gambar 5) menunjukkan bahwa nilai log TPC daging ikan bandeng meningkat seiring dengan lamanya waktu penyimpanan. Nilai TPC ikan bandeng kontrol mengalami kenaikan lebih cepat dari ikan bandeng perlakuan. Nilai log TPC tertinggi terjadi ketika ikan memasuki fase busuk, yaitu 7,49 koloni/g untuk ikan bandeng kontrol dan 7,4 koloni/g untuk ikan bandeng perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa perendaman ikan bandeng dalam larutan inhibitor mengakibatkan aktivitas enzim katepsin terhambat. Nilai log TPC daging ikan bandeng fase *post rigor* dan busuk sudah berada diatas batas maksimum jumlah mikroba yang ditetapkan dalam SNI 01-2729-2006, yaitu dengan nilai maksimum 5×10^5 koloni/g atau nilai log TPC sebesar 5,70 koloni/g (BSN, 2006). Penelitian Salamah *et al.* (2010) menyebutkan bahwa nilai TPC ikan bandeng dalam kondisi *post*



Gambar 4. Nilai pH ikan bandeng selama penyimpanan suhu *chilling*.



Gambar 5. Nilai log TPC ikan bandeng selama penyimpanan suhu *chilling*

rigor yang disimpan selama 13 hari pada suhu *chilling* mempunyai jumlah koloni bakteri sebesar 6,85 koloni/g dan mengalami kenaikan setelah mencapai kondisi busuk selama 23 hari dengan jumlah koloni bakteri sebesar 7,38 koloni/g.

Mohammed dan Hamid (2011) melaporkan bahwa total mikroba pada ikan tilapia dan ikan lele yang disimpan selama 7 hari menggunakan es dengan perbandingan 1:1

adalah sebesar $1,7 \times 10^6$ dan $1,3 \times 10^6$ cfu/g. Ikan tilapia dan lele yang disimpan pada refrigrasi selama 7 hari memiliki jumlah mikroba sebanyak $1,1 \times 10^7$ cfu/g dan $1,6 \times 10^7$ CFU/g. Thai Agricultural Commodity and Food Standard (TACFS 7001, 2004) menunjukkan bahwa titik kritis daging tilapia yang terkontaminasi bakteri memiliki total bakteri tidak lebih besar dari 1×10^7 cfu/g daging ikan.

Ikan yang disimpan pada suhu *chilling* membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencapai jumlah bakteri yang sama dengan ikan yang disimpan pada suhu ruang pada setiap tahap kemunduran mutu. Menurut Hidayati (2005) berbagai kondisi suhu dan lama penyimpanan memberikan pengaruh terhadap kandungan protein dan total koloni pada ikan bandeng. Jumlah bakteri pada ikan akan terus mengalami peningkatan seiring dengan lamanya penyimpanan. Pengaruh suhu pada pertumbuhan bakteri akan tampak jelas pada siklus pertumbuhannya, terutama perpanjangan atau perpendekan masa adaptasi yang tergantung pada tinggi rendahnya suhu. Suhu yang tinggi akan menyebabkan fase adaptasi menjadi lebih pendek. Sebaliknya suhu rendah akan menyebabkan fase adaptasi menjadi lebih panjang. Penyimpanan ikan pada suhu *chilling* merupakan salah satu cara untuk mengurangi laju kemunduran mutu ikan karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim (Clucas dan Sutcliffe 1981). Penelitian yang dilakukan Azanza *et al.* (2001) menunjukkan bahwa jenis mikroba yang ditemukan pada ikan bandeng adalah coliform, *Staphylococcus*, dan *Salmonella* spp.

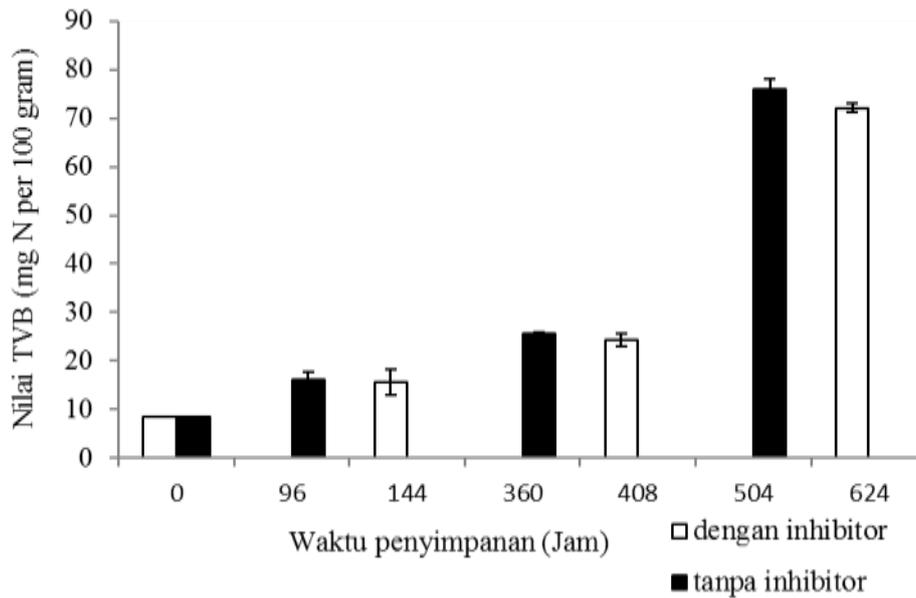
3.3.5. Nilai TVB

Indeks kemunduran mutu hasil perikanan dapat diketahui melalui kandungan TVB. Kandungan basa mudah menguap (TVB) merupakan hasil akhir penguraian protein, sehingga kadar TVB tersebut dapat dipakai sebagai indikator kerusakan ikan (Soedarto dan Siswanto 2008). Berbagai komponen TVB, seperti amonia (NH₃), DMA, dan TMA terakumulasi pada daging setelah ikan mati. Akumulasi ini terjadi akibat reaksi biokimia *post mortem* dan aktivitas mikroba pada daging. Gambar 6 menunjukkan bahwa nilai TVB daging ikan bandeng kontrol mengalami kenaikan yang lebih cepat dengan waktu pencapaian per fase yang lebih pendek dibandingkan dengan ikan bandeng perlakuan.

Ikan bandeng yang berada pada fase *pre rigor* termasuk dalam kategori sangat segar karena memiliki nilai TVB sangat rendah (8,41 mg N/100 g). Saat memasuki fase *rigor mortis* ikan bandeng termasuk dalam kategori segar baik pada ikan bandeng kontrol (nilai TVB 15,02 mg N/100 g) dan ikan bandeng perlakuan (nilai TVB 16,02 mg N/100 g) dengan waktu pencapaian *rigor mortis* 96 jam (kontrol) dan 144 jam (perlakuan). Ikan bandeng yang memasuki fase *post rigor* termasuk ke dalam ikan yang masih dapat diterima karena memiliki nilai TVB sebesar 24,42 mg N/100 g untuk ikan bandeng kontrol dan 25,63 mg N/100 g pada ikan bandeng perlakuan dengan lama waktu penyimpanan masing-masing 360 jam dan 408 jam. Ikan yang berada pada fase busuk memiliki nilai TVB yang lebih dari 30 mg N/100 g.

Farber (1965) mengklasifikasikan kesegaran ikan menjadi 4 kriteria berdasarkan nilai TVB. Ikan termasuk kriteria sangat segar apabila nilai TVB kurang dari 10 mg N/100 g. Ikan dengan nilai TVB antara 10-20 mg N/100 g termasuk dalam kriteria segar. Ikan termasuk kriteria masih bisa dikonsumsi apabila nilai TVB antara 20-30 mg N/100 g dan tidak bisa dikonsumsi apabila nilai TVB lebih dari 30 mg N/100 g. Taskaya *et al.* (2003) menyatakan bahwa nilai TVB antara 30-35 mg N/100 g masih bisa diterima oleh konsumen, sedangkan diatas 35 mg N/100 g dianggap sudah busuk. Gopakumar (2000) juga menyatakan bahwa nilai TVB antara 28-35 mg N/100 g adalah batas ikan masih bisa dikonsumsi. Berdasarkan batasan tersebut, ikan bandeng kontrol dan perlakuan yang disimpan pada suhu *chilling* masih dapat diterima dan layak untuk dikonsumsi sampai waktu penyimpanan memasuki fase *post rigor*.

Kenaikan nilai TVB disebabkan adanya pengaruh lama penyimpanan. Selain itu juga dipengaruhi oleh faktor suhu, komposisi garam, kondisi fisiologis, kandungan protein dan aktivitas enzim (Taskaya *et al.*, 2003).



Gambar 6. Nilai TVB ikan bandeng selama penyimpanan suhu *chilling*.

Nukleotida utama yang berperan dalam mentransfer energi yaitu ATP, juga berperan dalam penambahan jumlah amonia pada volatil amin setelah kematian ikan. Ketika ikan mati, kondisi menjadi anaerob dan ATP akan terurai dengan melepaskan energi (Jiang, 2000). Nukleotida ATP cepat berubah menjadi ADP oleh enzim ATPase, kemudian diubah menjadi AMP oleh mio-kinase. Selanjutnya AMP diubah oleh enzim deaminase menjadi IMP dan dari IMP diubah menjadi inosin oleh enzim fosfatase. Kemudian inosin dengan cepat berubah menjadi hipoksantin. Deaminasi AMP menjadi IMP telah melepaskan molekul amonia (NH_3) dari gugusan basa purin adenin (Eskin *et al.*, 1990).

IV. KESIMPULAN

Inhibitor katepsin baik digunakan sebagai penghambat kemunduran mutu ikan bandeng setelah diencerkan menggunakan bufer dengan perbandingan 1:1. Perendaman ikan bandeng dalam larutan inhibitor katepsin selama 1 jam sebelum disimpan pada suhu *chilling* mampu menghambat kemunduran mutu selama 120 jam (5 hari).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal DIKTI, Departemen Pendidikan Nasional melalui surat perjanjian pelaksanaan desentralisasi penelitian nomor 14/13.24.4 /SPK/BG-PD/2009 dengan ketua peneliti Tati Nurhayati.

DAFTAR PUSTAKA

- An, H., Y.M. Peters, T.A. Seymour, and M.T. Morrissey. 1995. Isolation and activation of cathepsin Linhibitor complex from Pacific Whiting (*Merluccius productus*). *J. Agric. Food Chem.*, 43:327-330.
- Aoki, T., T. Yamashita, and R. Ueno. 2000. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *J. Fisheries Sci.*, 66 (4):776-782.
- Apriyanti M. 2007. Peranan inhibitor katepsin dalam menghambat proses kemunduran mutu ikan nila (*Oreochromis sp.*) [skripsi]. Program studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 85hlm.

- Azanza, M.P.V., M.P. Ortega, R.G. and R.G. Valdezco. 2001. Microbial quality of rellonado milkfish (*Chanos chanos*, Forskal). *Food Control*, 12:365-371.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Standar Nasional Indonesia 01-2346. 20-06. Uji Organoleptik Ikan Segar. Badan Standardisasi Nasional Indonesia. Jakarta. 137hlm.
- Chereta, R., D.L. Christine, L.A. Marie, and V.B. Veronique. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *J. Food Chem.*, 101(4):1474-1479.
- Clucas, I.J. and P.J. Sutcliffe. 1981. An introduction to fish handling and processing. Tropical Products Institute. London. 81p.
- Dinu, D., I.F. Dumitru, and M.T. Nechifor. 2002. Isolation and characterization of two cathepsins from muscle of *Carassius auratus gibelio*. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 7(3):753-758.
- Eskin, N.A.M., H.M. Henderson, and R.J. Townsend. 1990. Biochemistry of Food. *Second Edition*. Academic Press. Inc. New York. 58p.
- Hidayati, L. 2005. Pengaruh suhu dan lama penyimpanan dalam penyimpanan freezer lemari es terhadap kandungan protein dan jumlah total koloni bakteri ikan bandeng (*Chanos chanos*). [Tesis]. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. 66hlm.
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome. 167p.
- Hutagalung, S., A.D. Patria, R. Alex, Ramli, M. Ayubar, and Kusdiantoro. 2007. Sewindu DKP mengawal pembangunan negara kepulauan. Pusat Data, Statistik dan Informasi DKP. Jakarta. 90hlm.
- Jiang, S.T. 2000. Enzymes and their effects on seafood texture. In: Haard, N.F., B.K. Simpson (eds.). *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, Inc. New York. 411-450pp.
- Kolodziejska, I. and Z.E. Sikorski. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates - A review. *J. Food Biochem.*, 20:349-363.
- Ladrat, C.D., V.B. Veronique, J. Noel, and J. Fleurence. 2004. Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *J. Food Chem.*, 84:441-446.
- Li, D.K., L. Hong L, and M.K. Sang. 2008. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 106-111.
- Lopez-Caballero, M., O. Martinez-Alvarez, M.C. Gomez-Guillen, and P. Montero. 2006. Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 223:7-15.
- Mohammed, I.M.A. and S.H.A. Hamid. 2011. Effect of chilling on microbial load of two fish species (*Oreochromis niloticus* and *Clarias lazera*). *Am. J. Food and Nutr.*, 1(3):109-113.
- Nurhayati, T., E. Salamah, dan N. Fentiana. 2010a. Peranan enzim protease jeroan ikan bandeng (*Chanos chanos*) dalam proses kemunduran mutu ikan. Prosidings Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan. 25-34hlm.

- Nurhayati, T., E. Salamah, M. Irfan, dan R. Nugraha. 2010b. Aktivitas enzim katepsin dan kolagenase pada kulit ikan bandeng (*Chanos chanos*, Forskal) selama periode kemunduran mutu. *Akuatik*, 4(1):30-34.
- Nurhayati, T., E. Salamah, K. Tampubolon, dan A. Apriland. 2011. Peranan inhibitor katepsin dari ikan patin (*Pangasius hyphopthalmus*) untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskal). *JPHPIXIV*, (1):49-55.
- Nurhayati T., E. Chasanah, dan S. Bahri. 2013a. Potensi inhibitor katepsin dari tiga jenis kulit ikan patin dalam menghambat aktivitas katepsin ikan patin siam. *JPB Perikanan*, 8(2):93-102.
- Nurhayati, T., S. Rusyadi, R. Suwandi, dan R. Nugraha. 2013b. Purification and characterization of a cathepsin inhibitor from catfish (*Pangasiussp.*) of Indonesian Water. *IFRJ*, 20(2):941-946.
- Salamah E., T. Nurhayati, Rustamaji. 2010. Aktivitas enzim katepsin dan kolagenase pada ikan bandeng (*Chanos chanos*) selama periode kemunduran mutu. *Logika*, 7(2):73-79.
- Thai Agricultural Commodity and Food Standard (TACFS). 2004. Tilapia. National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards (ACFS). TACFS 7001-2004. 8p.
- Taskaya L., S. Cakli, and U. Celik. 2003. A study on the quality changes of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L.,1758) and Seabass (*Dicentrarchus labrac* L.,1758) under the market conditios. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 20:313-320.
- Taylor, R.G., G.H. Geesink, V.F. Thompson, M. Koohmarie, and D.E. Goll. 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J. Anim Sci.*, 73:1351-1367.
- Diterima* : 17 Februari 2015
Direview : 30 April 2015
Disetujui : 21 Desember 2015