

**DAMPAK OKSIDASI PROTEIN OLEH SISTIM OKSIDASI 2, 2'- azobis
(2 am idipropane) dyhydrochloride (AAPH) DAN SISTIM KATALIS
LOGAM $CuSO_4 / H_2O_2$ TERHADAP KOMPOSISI ASAM AMINO
PROTEIN DAGING MERAH DAN PUTIH IKAN TONGKOL PUTIH
(*Thunus sp*)**

*Effect of 2,2'Aazobis (2 Amidipropane) Dyhydrochloride (AAPH)
and Catalysts $CuSO_4/H_2O_2$ Oxidation Systems on Amino Acid Compostion
of Red and White Meat of *Thunus sp* Fish*

Daniel A.N. Apituley¹, Zuheid Noor², Purnama Darmadji² dan Suparmo²

ABSTRACT

*Protein endured oxidative damage from oxygen radicals in 2,2'azobis (2 amidipropane) dyhydrochloride (AAPH) and catalysts $CuSO_4/H_2O_2$ oxidation systems. Indications of oxidation could be seen in the development of carbonyl protein and other more reactive substances such as protein peroxide, denaturation of the protein, as well as damages on the amino acids constituents of the protein such as hystidine, arginine, tyrosine, metionine, cysteine and tryptophane. The research was aimed to study the effect of oxygen radicals exposure in AAPH and catalysts $CuSO_4/H_2O_2$ oxidation systems on amino acid content of *Thunus sp* fish meat proteins. Result indicated that histamine, arginine, tyrosine, methionine, and phenylalanine amino acids in red meat undergone substantial reductions of 52.24%, 23.29%, 42.34%, 22.22%, and 6.77% in AAPH system, and 12.34%, 27.5 9%, 31.95%, 23.39%, and 13.02% in catalyst $CuSO_4/H_2O_2$ oxidation system, respectively. While milder reduction of those amino acids in white meat of 48.21%, 9.12%, 15.31%, 38.22%, and 22.44% in AAPH system, and 8.43%, 3.85%, 10.88%, 24.05%, and 57.25% in catalyst system, respectively. It was obvious that red meat undergone more damages in both oxidation systems compared to the white meat counterpart.*

Key words: *protein oxidation, AAPH, $CuSO_4/H_2O_2$, red meat, white meat, amino acids, *Thunus sp*.*

PENDAHULUAN

Protein merupakan biomolekul utama yang sangat berpengaruh pada karakteristik fisik maupun kimiawi bahan pangan termasuk daging ikan oleh karena itu terjadinya oksidasi pada protein akan memberikan efek yang signifikan terhadap integritas dari bahan pangan (daging ikan) tersebut.

Konsekwensi akibat terjadinya oksidasi pada protein antara lain terjadinya perubahan konformasi struktur tiga dimensi (akibat perubahan pada struktur sekunder dan gugusan disulfida, meningkatnya hidropobisitas) kehilangan aktifitas enzimatik, berkurangnya kelarutan (terjadinya agregasi dan pembentukan kompleks protein), perubahan warna (reaksi pencoklatan), dan perubahan kandungan gizi (hilangnya

¹ Fakultas Perikanan, Universitas Pattimura, Ambon, Indonesia.

² Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281.

asam-asam amino tertentu) serta perubahan sifat-sifat fungsional dari protein seperti *emulsifying*, *foaming*, maupun kemampuan membentuk gel (Leaver dkk., 1999b; Viljanen dkk., 2004; Munasinghe, 2005). Oleh karena itu protein yang mengalami kerusakan oksidatif akan menjadi kurang bermanfaat lagi jika ditinjau dari segi nutrisionalnya bahkan mungkin akan berdampak negatif bagi kesehatan bila terus menerus dikonsumsi.

Protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksid, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya (Davies, 2003).

Daging ikan umumnya tersusun atas dua jenis daging yaitu daging merah yang terdapat disepanjang tubuh bagian samping dibawah kulit dan daging yang berwarna putih terdapat diseluruh bagian tubuh ikan, keduanya sangat rentan terhadap serangan oksidatif. Adanya kromoprotein (hemoglobin dan mioglobin) yang dapat berperan sebagai fotosensitizer, lipid, glikogen dan enzim-enzim metabolik aerobik serta asam-asam amino yang sangat peka terhadap serangan radikal-radikal pengoksidasi seperti triptofan, histidin, arginin, tirosin, sistein, metionin, fenilalanin pada daging ikan merupakan faktor yang berpengaruh pada rentan atau tidaknya protein daging tersebut terhadap serangan oksidatif. Menurut Andersen dan Odstal (2001), protein merupakan target oksidasi yang potensial karena selain merupakan komponen terbesar dalam bahan pangan, dua puluh rantai samping yang berbeda-beda dari asam-asam amino penyusun protein juga merupakan target yang potensial dari serangan oksidan. Dimana serangan tersebut diawali dengan adanya abstraksi atom hidrogen yang berasal dari rantai samping (*side chain*) asam amino penyusun protein maupun pada kerangka utama (*backbone*) protein tersebut. Sumber atom hidrogen berasal dari rantai samping alifatik, aromatik, residu sistein dan sistin serta metionin (Davies, 2005).

Protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksid, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya (Davies, 2003). Radikal-radikal oksigen ini dapat dihasilkan dalam sistim biologis secara alami maupun secara eksperimen. Secara eksperimental radikal hidroksil (OH*) dapat dihasilkan dari radiolisis sinar gamma pada molekul air, maupun oleh sistim katalis logam pengoksidasi. Dalam percobaan ini radikal hidroksil (OH*) dihasilkan dari sistim katalis logam pengoksidasi $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ (Leeuwenburgh dkk., 1988; Huggins dkk., 1993; Koscha dkk., 1997). 2, 2'-azobis (2 amidipropane) dyhydrochloride (AAPH) adalah merupakan salah satu pembangkit senyawa oksigen reaktif (ROS) yang sering digunakan pada eksperimen-eks-

perimen tentang oksidasi dalam bidang biokimiawi maupun pangan. Dekomposisi thermal dari senyawa Azo yang larut air ini pada suhu fisiologis dapat menghasilkan radikal-radikal bebas (Dean dkk., 1997; Lanping dkk., 2000). Menurut Chao dkk. (1997), pada kondisi aerobik akan terjadi dekomposisi primer terhadap AAPH yang dapat menghasilkan *carbon-centered radical* yang selanjutnya akan terdekomposisi lebih lanjut menjadi radikal-radikal oksigen seperti radikal peroksid dan alkil peroksida. Radikal-radikal oksigen ini yang kemudian menyerang protein sehingga menyebabkan terbentuknya radikal-radikal pada protein (*-carbon radical* maupun *side-chain radical*) yang kemudian mengalami dekomposisi lebih lanjut menjadi peroksida-peroksida protein serta derivat-derivat senyawa karbonil dari protein (Dean dkk., 1997; Morgan dkk., 2003).

Sejauh ini informasi dan penelitian mengenai terjadinya oksidasi pada protein daging ikan, terutama stabilitas oksidatif protein ikan dari bagian daging merah dan putih masih sangat jarang ditemukan dan belum banyak dipelajari secara detail. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan kajian tentang dampak terjadinya oksidasi pada protein terhadap kandungan asam-asam amino baik dari protein daging merah maupun daging putih. Pendekatan yang dilakukan adalah dengan melakukan percobaan oksidasi secara *invitro* dengan menggunakan model preparat protein daging merah dan putih dari Ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji dampak terjadinya oksidasi oleh radikal-radikal oksigen yang dihasilkan melalui sistem oksidasi AAPH dan katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ terhadap kandungan asam-asam amino protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini semuanya berkualitas PA antara lain methanol, asam triklorasetat, tembaga (II) sulfat, buffer fosfat 50 mM (pH 7,4), hidrogen peroksida, Tetrahidrofur (Merck), natrium asetat, Buffer Borat (pH 9,1), 2, 2'-azobis (2 amidipropane) dyhydrochloride (AAPH) (Sigma) dan, O-ptaldehid (OPA) (Sigma), -mercaptoetanol, natrium hidroksida, asam klorida dan akuabides.

Cara penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi dua bagian yaitu persiapan sampel dan percobaan oksidasi dengan menggunakan sistim oksidasi 2, 2'-azobis (2 amidipropane) dyhydrochloride (AAPH) dan sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$.

Persiapan sample. Pertama, dilakukan pembuatan preparat protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih. Pada Tahapan ini dilakukan pemisahan bagian daging merah dan putih serta dilakukan pengurangan lemak (delipidasi) terhadap kedua jenis daging tersebut. Proses delipidasi dilakukan dengan cara ekstraksi dengan campuran antara 200 ml metanol dan 100 ml dietil eter (2:1) per 100 g daging selama 30 menit. Keseluruhan proses tersebut dilakukan dalam suatu “kotak preparasi” yang dihembus dengan gas nitrogen pada suhu 4°C. Preparat yang dihasilkan kemudian di kering bekukan dan sebelum dilakukan oksidasi, terlebih dahulu dianalisis kadar protein, lemak, air, abu, kadar asam amino bebas (FAAN/*Free Alpha Amino Acid Nitrogen*) serta kandungan zat besinya.

Percobaan oksidasi dengan 2, 2'-azobis (2 amidipropene) dyhydrochloride (AAPH) dan sistem katalis logam CuSO₄/H₂O₂. Pada tahapan ini dilakukan percobaan dampak oksidasi protein oleh radikal pengoksidasi yang dihasilkan melalui sistem oksidasi AAPH dan katalis logam CuSO₄ / H₂O₂ terhadap kandungan asam-asam amino protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*). Dalam percobaan ini radikal pengoksidasi dihasilkan dari sistim pembangkit radikal yaitu 2,2'-azobis (2 amidipropene) dyhydrochloride (AAPH) (Thomas dan Malis, 2001; Chao dkk., 1987) serta sistim katalis logam CuSO₄/H₂O₂ (Leeuwenburgh, 1988; Huggins dkk., 1993; Koscha dkk., 1997). Preparat Protein daging ikan (1 g/ml) dihomogenisasikan dalam larutan sistim oksidasi 50 mM AAPH dan dalam sistim katalis logam CuSO₄/ H₂O₂ 8 mM, kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 24 jam. Parameter yang dianalisis adalah kadar asam amino protein daging merah dan putih ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*). Analisis kadar asam amino dilakukan dengan menggunakan metode Supelco (1985) yang telah dimodifikasi. Jalannya analisis adalah sebagai berikut.

Hidrolisis protein. Sebelum dianalisis asam aminonya, 100 mg sampel protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol (*Thunus sp*) terlebih dahulu di hidrolisis guna memecah protein menjadi asam-asam amino dengan menggunakan 4 ml HCl 6N dan kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105 °C selama 24 jam. Setelah dihidrolisis selama 24 jam, sampel kemudian dinetralkan dengan penambahan NaOH 6 N sampai pH-nya netral (pH 7,0). Setelah itu sampel disaring dengan membran filter Whatman 0,45 µm dan selanjutnya diderivatisasi terlebih dahulu sebelum diinjeksikan pada HPLC. Proses derivatisasi dilakukan dengan menggunakan larutan OPA (*O-Pthaldehyde*) yang merupakan campuran antara 100 mg OPA, 4 ml Buffer Borat pH 9,1 dan 1 ml Metanol serta 1-2 tetes - *mercaptoethanol*.

Analisis asam amino dengan HPLC. Analisis asam amino dilakukan dengan kolom Shimpack – CLC – ODS(M) menggunakan Eluen A yaitu 0,05 M Na-Asetat yang mengandung 2% THF (Tetrahydrofuran) dan 2% Methanol serta Eluen B berupa Methanol 65 %. Eluen A dibuat dengan cara mencampurkan 960 ml larutan Na-Asetat 0,05 M dengan THF dan Methanol masing-masing 20 ml. Campuran tersebut kemudian diatur pH-nya menjadi 6,8 dengan menambahkan NaH₂PO₄. Sedangkan Eluen B dibuat dengan mencampurkan 650 ml Methanol dengan 350 ml Akuabides.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi kimia dan kadar asam amino protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*)

Hasil analisis komposisi kimiawi protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunus Sp*) dapat di lihat pada Tabel 1.

Table 1. Chemical composition red and white meat of *Thunus sp* fish

No	Komposisi Kimiawi	Jenis Daging			
		Merah		Putih	
		Segar	Preparat	Segar	Preparat
1.	Protein (%)	19.20	89.17	19.55	92,68
2.	Lemak (%)	2.16	0.98	1.20	0.60
3.	Abu (%)	1.53	1.59	1.69	1.92
4.	Air (%)	78.07	10.9	77.45	12.18
5.	FAAN (mgN/100g)	34.34	41.16	64.49	69.75
6.	Fe (mg/Kg)	-	464.29	-	219.23

Dari Tabel 1 terlihat bahwa proses delipidasi yang dilakukan ternyata dapat menurunkan kandungan lemak daging ikan Tongkol Putih dari 2,16 % menjadi 0,98 % untuk da-

ging merah dan 1,20 % menjadi 0,60 % untuk daging putih. Dengan berkurangnya kandungan lemak pada daging ikan, diharapkan dapat meminimalkan interfensi dari lipida atau

lemak terhadap terjadinya kerusakan oksidatif pada protein ikan. Pada Tabel 1, juga terlihat adanya perbedaan komposisi kimiawi dari protein daging merah dan putih terutama tingginya kandungan zat besi (Fe) pada daging merah (464,29 mg/kg) bila dibandingkan dengan daging putih (219,23 mg/kg) tentunya akan berpengaruh terhadap kemungkinan terjadinya kerusakan oksidatif pada kedua jenis daging tersebut. Dimana tingginya kandungan zat besi (Fe) ini merupakan salah satu faktor penyebab rentannya protein daging merah terhadap kerusakan oksidatif. Zat besi tersebut selain dapat berfungsi sebagai prooksidan yang berperan dalam proses

terbentuknya radikal hidroksil, juga dapat bereaksi secara langsung dengan oksigen membentuk kompleks besi-oksigen yang mempunyai kemampuan mengoksidasi (Rahardjo, 2004).

Penentuan jenis asam amino dalam protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunnus sp*) dilakukan dengan mencocokkan kromatogram sampel dengan kromatogram asam amino standar baik berdasarkan pola kromatogramnya maupun waktu retensinya. Hasil analisis kadar asam amino pada protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Amino acids composition of red and white meat of *Thunnus sp* fish

No	Asam Amino	Daging Merah (g/100 g daging)	Daging Putih (g/100 g daging)
1.	Asam Aspartat	9.63	7.98
2.	Asam Glutamat	9.74	8.62
3.	Serin	2.66	2.41
4.	Histidin	2.45	2.24
5.	Arginin	2.79	2.85
6.	Glisin	2.13	1.88
7.	Threonin	0.78	0.91
8.	Alanin	3.95	6.00
9.	Tirosin	3.85	3.31
10.	Metionin	1.71	2.12
11.	Valin	2.39	3.14
12.	Phenilalanin	1.92	5.62
13.	Isoleusin	2.70	2.72
14.	Leusin	3.37	2.84
15.	Lisin	5.06	4.35
T o t a l		55.13	56.99

Dari Tabel 2, terlihat bahwa pada protein daging merah asam amino yang paling tinggi jumlahnya adalah asam glutamat, asam aspartat, lisin, alanin dan tirosin. Kandungan asam-asam amino tersebut masing-masing adalah 9.74 ; 9.63 ; 5.06; 3.95 dan 3.85 g/100 g daging. Pada protein daging putih, asam amino yang paling tinggi jumlahnya adalah asam glutamat, asam aspartat, alanin, fenilalanin dan lisin. Kandungan asam-asam amino tersebut masing-masing adalah 8.62; 7.98; 6.00; 5.62 dan 4.35 g/100 g daging. Sedangkan asam amino yang paling rendah jumlahnya baik pada protein daging merah dan putih adalah treonin yakni sebesar 0.78 g/100 g daging untuk protein daging merah dan 0.91 g/100 g daging untuk protein daging putih.

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, threonin, alanin, tirosin, triptofan, sistein, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin dan prolin (Zaitsev dkk., 1969; Konusu dan Yamaguchi, 1982; Sikorski, 1990). Dari hasil analisis yang dilakukan hanya 15 asam amino yang teridentifikasi sedangkan 3 asam amino yaitu triptofan, sistein dan prolin tidak teridentifikasi. Hal ini bukan disebabkan karena protein daging ikan tidak mengandung ketiga asam amino tersebut melainkan karena metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini. Menurut Ashman dan Bosserhoff (1985) teknik HPLC dengan derivatisasi prekolom dengan OPA (*-ptaldehyde*) memiliki kekurangan karena kegagalan dengan cara ini dalam mendeteksi asam amino sekunder seperti prolin dan hidroksiprolin, serta sistein yang tidak dapat bereaksi secara sempurna dengan OPA. Sedangkan triptofan

akan mengalami kerusakan bila dilakukan hidrolisis asam amino dengan menggunakan asam (HCl). Keberadaan asam-amino ini pada daging ikan cukup penting untuk diketahui terutama triptofan dan sistein karena keduanya termasuk asam-asam amino yang kaya akan elektron sehingga sangat mudah mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya serangan dari radikal maupun molekul non radikal pengoksidasi.

Dampak oksidasi oleh radikal pengoksidasi dari AAPH dan sistem katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ terhadap kandungan asam amino protein daging merah dan putih ikan tongkol putih (*Thunus sp*).

Protein dapat mengalami kerusakan oksidatif oleh adanya radikal-radikal pengoksidasi antara lain: radikal hidroksil, radikal peroksil, radikal alkoksil dan beberapa radikal lainnya. Radikal-radikal oksigen tersebut dapat dihasilkan dalam sistim biologis maupun secara eksperimen, seperti dari sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ maupun dari AAPH yang dikenal sebagai pembangkit radikal peroksil. Radikal-radikal oksigen yang dihasilkan dari ke-2 sistim oksidasi ini yang dapat

menyebabkan timbulnya kerusakan oksidatif pada berbagai makromolekul dalam sistim biologi maupun bahan pangan termasuk protein. Menurut Davies (2003), serangan radikal-radikal oksigen dapat terjadi pada kerangka utama (*backbone*) protein dengan cara mengabstraksi atom hidrogen pada atom $\text{C}-$, dimana akibat dari serangan ini dapat menyebabkan terjadinya fragmentasi pada kerangka protein tersebut. Serangan radikal oksigen ini juga dapat terjadi pada rantai samping asam-asam amino penyusun protein yakni dengan cara mengabstraksi atom hidrogen pada rantai samping asam-asam amino alifatik serta melalui reaksi adisi terutama pada rantai samping asam-asam amino aromatik. Dimana akibat dari serangan ini akan menyebabkan terjadinya modifikasi struktur rantai samping dari asam-asam amino tersebut.

Dampak oksidasi oleh radikal-radikal oksigen yang dihasilkan dari AAPH 50 mM dan Sistim Katalis Logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ 8 mM terhadap kandungan asam amino dari protein daging merah dan putih ikan Tongkol Putih dapat dilihat pada Tabel 3.

Table 3. Effect of AAPH and $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ oxidation system on amino acids composition of red and white meat of *Thunus sp* Fish.

No	Asam Amino	Daging Merah (g /100 g daging)					Daging Putih (g /100 g daging)				
		Tanpa Oksidasi	AAPH 50 mM	% kehilangan	$\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ 8 mM	% kehilangan	Tanpa Oksidasi	AAPH 50 mM	% kehilangan	$\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ 8 mM	% kehilangan
1	Asam Aspartat	9.63	5.62	41.61	7.04	26.89	7.98	6.64	16.79	7.51	5.53
2	Aam Glutamat	9.74	8.71	10.57	8.25	15.29	8.62	7.49	13.10	8.36	3.01
3	Serin	2.66	1.87	29.69	2.29	13.91	2.41	1.94	19.50	2.21	8.29
4	Histidin*	2.45	1.17	52.24	2.15	12.34	2.24	1.16	48.21	2.05	8.43
5	Arginin*	2.79	2.14	23.29	2.02	27.59	2.85	2.59	9.12	2.74	3.85
6	Glisin	2.13	1.45	31.95	2.31	-	1.88	1.46	22.34	1.26	32.97
7	Threonin	0.78	0.72	7.69	0.64	17.95	0.91	0.66	27.47	1.59	-
8	Alanin	3.95	2.86	27.59	3.12	21.01	6.00	3.01	49.83	3.64	39.30
9	Tirosin*	3.85	2.22	42.34	2.62	31.95	3.31	2.79	15.31	2.95	10.88
10	Metionin*	1.71	1.33	22.22	1.31	23.29	2.12	1.31	38.21	1.61	24.05
11	Valin	2.39	2.11	11.71	1.71	28.45	3.14	1.91	39.17	2.48	21.02
12	fenilalanin*	1.92	1.79	6.77	1.67	13.02	5.62	4.37	22.24	2.40	57.29
13	Isoleusin	2.70	2.08	22.96	2.13	21.11	2.72	2.24	17.64	2.44	10.29
14	Leusin	3.37	2.27	32.60	2.73	18.99	2.84	3.08	-	2.63	7.39
15	Lisin	5.06	3.87	23.52	3.29	34.98	4.35	3.82	12.80	3.98	8.50
T o t a l		55.13	40.21		43.91		56.99	44.47		47.85	

* Asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen (Davies,2003)

Pada Tabel 3, terlihat bahwa hampir semua asam amino rentan terhadap serangan dari radikal-radikal oksigen yang dihasilkan dari sistim oksidasi AAPH dan sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Ini ditunjukkan dengan terjadinya penurunan kandungan asam-asam amino tersebut baik pada protein daging merah maupun putih akibat perlakuan oksidasi dengan kedua sistim oksidasi tersebut. Menurut Davies *dkk.* (1987), seluruh asam amino penyusun protein rentan terhadap serangan dari radikal – radikal oksigen. Sebagai perbandingan, dalam penelitiannya terhadap protein BSA (*bovine serum albumin*) yang diberi perlakuan oksidasi dengan radikal hidroksil menunjukkan bahwa persentase kehilangan terbesar terjadi pada histidin (64,72%) dan metionin (50%). Sedangkan asam amino lain seperti lisin, glisin, isoleusin, fenilalanin, serin, treonin dan tirosin persentase kehilangannya berkisar antara 40 - 45 % dan asam amino yang persentase kehilangannya lebih rendah adalah arginin, valin dan alanin dengan persentase 35 - 39 %.

Menurut Davies (2003), asam-asam amino seperti tirosin, histidin, triptofan, fenilalanin, arginin, sistein dan metionin merupakan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen (terutama radikal hidroksil) sedangkan yang kereaktifannya lebih rendah adalah alanin, asam aspartat dan asparagin.

Dari Tabel 3, terlihat bahwa persentase kehilangan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen yakni histidin, arginin, tirosin, metionin, dan fenilalanin pada protein daging merah (kecuali triptofan dan sistein yang juga terdapat dalam protein ikan namun tidak terdeteksi oleh metode analisis dalam penelitian) masing-masing sebesar 52.24%; 23.29%; 42.34%; 22.22% dan 6.77% pada sistim oksidasi AAPH serta 12.34%; 27.59%; 31.95%; 23.39% dan 13.02% pada sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Pada Protein daging putih, persentase kehilangan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen yakni histidin, arginin, tirosin, metionin, dan fenilalanin adalah sebesar 48.21%; 9.12%; 15.31%; 38.22%; dan 22.44% pada sistim oksidasi AAPH serta 8.43%; 3.85%; 10.88%; 24.05% dan 57,25 % untuk sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Dari hasil diatas, secara keseluruhan terlihat bahwa persentase kehilangan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal hidroksil pada protein daging merah lebih besar bila dibandingkan dengan yang terjadi pada protein daging putih. Hal ini menunjukkan bahwa protein daging merah lebih rentan terhadap serangan dari radikal-radikal oksigen dari sistim oksidasi AAPH maupun sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Serangan dari radikal-radikal oksigen terhadap protein dapat menyebabkan terjadinya kerusakan atau modifikasi dari asam-asam amino penyusun protein tersebut. Dimana

dampak dari terjadinya kerusakan tersebut akan berpengaruh pada struktur maupun sifat fungsional dari protein tersebut serta terbentuknya senyawa-senyawa karbonil protein. Hasil penelitian tersebut diatas dapat lebih menunjang hasil-hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Apituley *dkk.* (2005 & 2006), dimana hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa serangan radikal-radikal oksigen baik dari sistim oksidasi AAPH maupun sistim katalis logam dapat menyebabkan terjadinya peningkatan protein karbonil serta terjadinya denaturasi atau modifikasi struktur dari protein baik daging merah maupun daging putih dari ikan Tongkol Putih. Dan peningkatan terbesar terjadi pada protein daging merah bila dibandingkan dengan protein daging putih. Menurut Davies (2003), besarnya kerusakan oksidatif yang ditimbulkan dalam suatu proses oksidasi tergantung pada target dan kecepatan reaksi antara oksidan dengan molekul target. Berdasarkan hal tersebut, jika dilihat kerentanannya terhadap serangan dari radikal-radikal oksigen maka dapat dikatakan bahwa protein daging merah cenderung lebih reaktif terhadap radikal-radikal oksigen bila dibandingkan dengan protein daging putih.

KESIMPULAN

Asam-asam amino penyusun protein daging merah dan putih dari ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*) yang berhasil diidentifikasi adalah asam aspartat, asam glutamat, serin, histidin, arginin, glisin, threonin, alanin, tirosin, metionin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin dan lisin. Hampir semua asam-asam amino ini rentan terhadap serangan radikal-radikal oksigen yang berasal dari sistim oksidasi AAPH maupun dari sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Persentase kehilangan asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen yakni histidin, arginin, tirosin, metionin, dan fenilalanin pada daging merah masing-masing 52.24%; 23.29%; 42.34%; 22.22% dan 6.77% pada sistim oksidasi AAPH serta 12.34%; 27.59%; 31.95%; 23.39% dan 13.02% pada sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Sedangkan pada protein daging putih, persentase kehilangannya masing-masing 48.21%; 9.12%; 15.31%; 38.22%; dan 22.44% pada sistim oksidasi AAPH serta 8.43%; 3.85%; 10.88%; 24.05% dan 57,25 % pada sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. Dari hasil tersebut terlihat bahwa persentase kehilangan dari asam-asam amino yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen pada protein daging merah lebih besar bila dibandingkan dengan daging putih. Ini menunjukkan bahwa protein daging merah lebih rentan terhadap serangan dari radikal-radikal oksigen yang dihasilkan dari sistim oksidasi AAPH dan sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, S., Green, P., Claxton, R., Simcox, S., Williams, M.V., Walsh, K. dan Leeuwenburgh, C. 2001. Reactive carbonyl formation by oxidative and nonoxidative pathways. *Bioscience* **6a**: 17-24.
- Andersen, H.J. dan Odstal, H. 2001. *Protein oxidation in foods: Mechanism and implications*. Dept. of Animal Products Quality. Danish Institute of Agriculture Science. Denmark.
- Apituley, A.N.D., Noor, Z., Darmadji, P. dan Suparmo. 2005. Oksidasi protein daging merah dan putih pada ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*) oleh sistim katalis logam $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$. *Agritech* **25**: 180-185.
- Apituley Daniel, A.N., Zuheid Noor, Purnama Darmadji dan Suparmo. 2006. Oksidasi protein daging merah dan putih pada ikan Tongkol Putih (*Thunus sp*) oleh 2, 2'- azobis (2 amidipropene) dyhidrochloride (AAPH). "Ichthyos" *Jurnal Penelitian Ilmu-ilmu Perikanan dan Kelautan* **5**: 21-26.
- Bellevile-Nabet, F. 1996. Zat Gizi Antioksidan Penangkal Senyawa Radikal Pangan Dalam Sistim Biologis. Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistim Pangan. Jakarta.
- Chao, C.C., Ma, Y.S. dan Stadman, E.R. 1997. Modification of Protein Surface Hidropobicity and Methionine Oxidation by Oxidative Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2969-2974.
- Davies, K.J., Delsignore, M.E. dan Lin, S.W. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *Journal Biological Chemistry* **262**: 9895-9901.
- Davies, M.J. 2003. Protein oxidation: Concepts, mechanism & new insight. www.medicine.uiowa.edu/frfb/SFRS/protein_ox.ppt.
- Davies, M.J. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochemica et Biophysica Acta* **1703**: 93-100.
- Dean, R.T., Shanlin, F.U., Stocker, R. dan Davies, M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Journal of Biochemistry*. **324**: 1-18.
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Koscha, T., Yamaguchi, M., Ohitaki, H., Fukuda, T. dan Aoyagi, T. 1997. Hidrogen peroxida-mediated degradation: different oxidation modes of Copper-and Iron dependent hydroxy radicals on the degradation of albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1337**: 319-26.
- Laksmi, B., Tilak, J.C., Adhikori, S., Devasagayan, T.P.A. dan Janardhanan. K. 2005. Inhibition of Lipid Peroxidation Induced by radiation and AAPH in Rat Liver & Brain Mitochondria by Mushrooms. *Current Science* **88**: 484 – 488.
- Lanping, M.A., Zaiqun, L., Bo, Z., Yang, L. dan Zhongly, L. 2000. Inhibition of free Radical Induced Oxidative Hemolysis of Red Blood Cells by Green Tea Polyphenols. *Chinese Science Bulletin* **45**: 2052-2056.
- Leaver, J., Law, A.J.R., Brechany, E.Y. dan McCrae, C.H. 1999b. Chemical change in lactoglobulin structure during ageing of protein-stabilized emulsions. *International Journal of Food Science and Technology* **34**: 503-508.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P., Shaish, A., Holloszhy, J. dan Heinecke, J.W. 1988. Markers of protein oxidation by hydroxy radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *American Journal of Physiology* **274**: R453-R461.
- Marx, G. dan Chevion, M. 1986. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with Copper(II) and ascorbate. *Journal of Biochemistry* **236**: 397-400.
- Miura, T., Muraoka, S. dan Ogiso, T. 1992. Oxidative damage to BSA induces by hydroxy radical generating systems of Xanthine oxidase + EDTA+Fe(III) and Ascorbate+EDTA+Fe(III). *Chemico Biological Interactions* **85**: 243-54.
- Morgan, P.E., Dean, R.T. and Davies, M.J. 2003. Protective mechanism against peptide and protein peroxide generates by singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: 484-496.
- Munasinghe, D.M.S., Ohkubo, T. dan Sakai, T. 2005 The lipid peroxidation induced changes of protein in refrigerated yellowtail minced meat. *Fisheries Science* **71**: 462-464.
- Nakhost, Z. dan Karel, M. 1983. Changes in Bovine Myoglobin Due to Interaction with Methyl Linoleate in a Model System. *Journal of Food Science* **48**: 1335-1339.
- Wolf, S.P. dan Dean, R.T. 1986. Fragmentation of proteins by free radicals and it's effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Journal of Biochemistry* **234**: 399-403.

Rahardjo, S. 2004. *Kerusakan Oksidatif Pada Makanan*. Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Sikorski, Z.E. 1990. *Seafood: Resource, Nutritional Composition and Preservation*. CRC Press Inc., Boca Rotan, Florida.

Spinelli, J. dan Dassow, J.D. 1982. Fish proteins: Their modification and potential uses in the food industry. Dalam Martin dkk.. (ed.) *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*. Avi Publishing Company, Westport. Connecticut.

Stadman, E.R. dan Oliver, C.N. 1991. Metal catalyzed oxidation of protein. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 2005-2008.

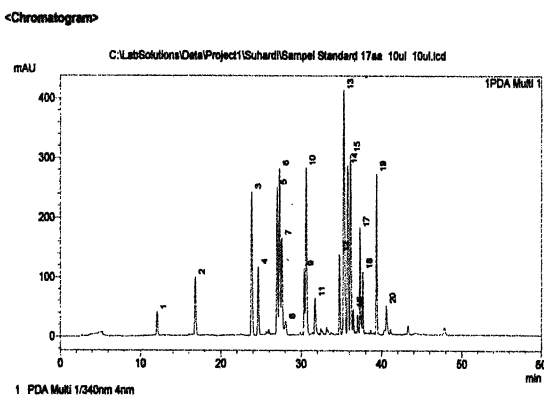
Hadiwiyoto, S. 1993. *Teknologi pengolahan ikan, Jilid I*. Yogyakarta. Penerbit Liberty.

Thomas, J.A. dan Mallis, R.J. 2001. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Experimental Gerontology* **36**: 1519-1526.

Viljanen, K.; Kivikari, R.; Heinonen, M. 2004. Protein-Lipid interaction during liposome with added anthocyanin and other phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**: 1104-1111.

Yan, L.J.; Lodge, J.K.; Traber, M.G.; Matsugo, S. dan Packer, L. 1997. Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by carbonyl formation. *Journal of Lipid Research* **38**: 992-1001.

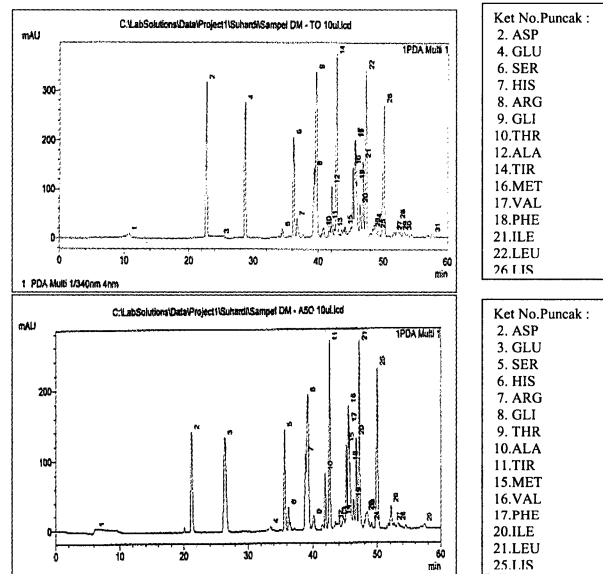
Lampiran 1.:



Kromatogram Asam Amino Standar dengan menggunakan HPLC sistem *Reversed Phase*.
Kondisi Operasional HPLC: Kolom Shimpack-CLC-(M) 25 cm

Stationary Phase : Octadesyl Group Separation Mode: *Reversed Phase*
Detector :UV SPDM 10AVP(340nm) & Temperatur Kolom :28°C
Eluen A : Na-Asetat 0.05M -THF2% -Methanol 2% - NaH₂PO₄.

Lampiran 2: Kromatogram asam amino protein daging merah dari Ikan Tongkol Putih Sebelum dan Sesudah dioksidasi dengan AAPH 50 mM



Lampiran 3 : Kromatogram asam amino protein daging putih dari Ikan Tongkol Putih Sebelum dan Sesudah dioksidasi dengan AAPH 50 mM

