PENGARUH ASAM ASKORBAT TERHADAP PEMBENTUKAN GEL MIOFIBRIL IKAN MATA BESAR (*Selar crumenophthalmus*)

[Effect of ascorbic acid on gel formation of myofibril from Bigeye Scad Fish (*Selar crumenophthalmus*)]

Achmad Subagio, Wiwik Siti Windrati, Mukhammad Fauzi dan Yuli Witono

Lab. Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember
Jl. Kalimantan I JEMBER 68121
e-mail: a_subagio@telkom.net

Diterima 15 Maret 2005 / Disetujui 18 Agustus 2005

ABSTRACT

Effects of ascorbic acid on gel formation of myofibrillar protein extracted from Bigeye Scad Fish (Selar crumenophthalmus) were studied for its development as food ingredient. Myofibril was gelled by the addition of various concentrations of ascorbic acid (0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4%), and the gels were then characterized for its cooking loss, water holding capacity (WHC), and texture. Addition of ascorbic acid at the level below 0.3% gave no significant effect on the cooking loss of the gel, but at 0.4% the cooking loss of the gel increased significantly. Accordingly, the WHC of the gel changed insignificantly with the ascorbic acid addition below 0.3%, and decreased sharply in the addition of 0.4%. Gel textures were affected by the addition of ascorbic acid at all levels, namely 29.9 ± 1.9, 31.0 ± 0.3, 35.4 ± 0.4, 46.7 ± 1.5, and 115.7 ± 3.2 g/7 mm for 0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4%, respectively. Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that addition of ascorbic acid drove formation of disulphide bond in the myosin heavy chain (MHC) and other myofibrillar proteins, resulting in the development of a strong three dimensions structure in myofibril gel as shown by microscopic structure.

Keywords : *Ascorbic acid, Bigeye Scad Fish (Selar crumenophthalmus), el formation myofibril*

PENDAHULUAN

Karena kandungan protein 17-24 % dari beratnya, ikan merupakan sumber protein hewani yang potensial (Fardiaz, 1995). Kandungan protein yang tinggi ini menyebabkan ikan menjadi bahan pangan yang sangat dianjurkan, apalagi dengan kandungan asam lemak omega-3-nya yang memberikan efek positif bagi kesehatan (Shahidi, 1998). Produksi ikan di Indonesia sangat tinggi dan menunjukkan kecenderungan meningkat setiap tahun Di Jawa Timur, produksinya mencapai 321.315, 346.748 dan 379.409 ton untuk tahun 1992, 1995 dan 1997 (Anonim, 1998). Namun demikian potensi yang sangat tinggi ini belum dapat dimanfaatkan secara optimal, terbukti dengan banyaknya ikan inferior yang terbuang akibat tidak tertangani secara baik sewaktu panen raya.

Ikan Mata Besar (*S. crumenophthalmus*) termasuk ikan pelagik yang berukuran maksimum 60 cm, dengan makanan berupa udang kecil, zooplankton dan larva ikan (Anonim, 2003a). Di Indonesia ikan Mata Besar sering tidak ditangani dengan baik terutama disaat panen raya, sehingga menjadi ikan yang bermutu rendah (ikan inferior). Pada saat panen raya, banyak nelayan mengalami kesulitan dalam memasarkan hasil ikan ini, bahkan kalaupun bisa terjual biasanya harganya relatif murah dan kadang-kadang terbuang. Untuk itu diperlukan usaha pemanfaatan ikan mata besar secara optimal, salah satunya adalah dengan memanfaatkannya menjadi bahan baku produk berbasis gel, seperti sosis, bakso dan nuget.

Protein otot ikan terdiri dari tiga kelompok utama yakni sarkoplasma, miofibril dan stroma. Protein miofibril merupakan bagian terbesar dan merupakan jenis protein yang larut dalam garam. Protein ini terdiri dari miosin, aktin, tropomiosin dan aktomiosin yang merupakan gabungan aktin dan miosin. Protein miofibril sangat berperan dalam pembentukan gel dan proses koagulasi, terutama dari aktomiosin. Gel ikan merupakan bentukan dari pasta daging ikan mentah (surimi) yang mengalami hasil pemanasan. Mutu gel ikan sangat dipengaruhi oleh kandungan aktin, miosin yang terdapat dalam protein miofibril ikan tersebut. Protein miofibril sangat berperan dalam proses pembentukan gel daging ikan (Anonim, 2003b).

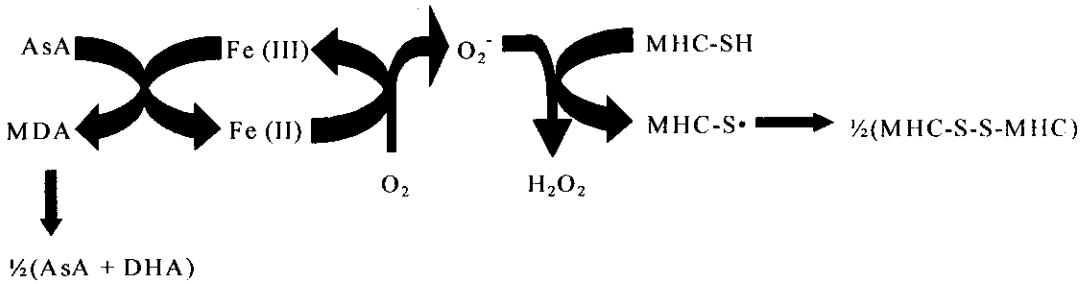
Hasil penelitian sebelumnya (Subagio, et al., 2004) menunjukkan bahwa fraksi terbesar pada ikan mata besar adalah myofibril (42 - 43%), diikuti oleh fraksi protein sarkoplasma (37 - 40 %) dan stroma (16 - 21 %). Sebagai ikan pelagik, mata besar mempunyai protein miofibril dengan kemampuan membentuk agregat yang lebih rendah dibandingkan ikan demersal, akibatnya protein myofibrilnya membentuk gel dengan tekstur yang tidak terlalu kokoh. Dengan demikian, pemanfaatan miofibril dari ikan mata besar pada produk berbasil gel memerlukan cara untuk meningkatkan konsistensi gelnya.

Pada penelitian sebelumnya (Nishimura, et al., 1996), dilaporkan bahwa penambahan asam askorbat terhadap pasta daging ikan dapat meningkatkan kekuatan gel pada gel miofibril ikan mentah. Penambahan asam askorbat dapat meningkatkan agregasi MHC, di mana mekanismenya melibatkan oksidasi-reduksi ion logam seperti Fe^{3+} atau Cu^{2+}, yang mendorong perubahan oksigen menjadi *singlet oxygen* yang reaktif. Senyawa ini akan mendorong terbentuknya radikal bebas dari MHC yang banyak mengandung gugus thiol. Selanjutnya radikal bebas gugus thiol dari MHC ini akan bergabung dengan sesama radikal bebas MHC untuk membentuk ikatan disulfida (Gambar 1). Pembentukan ikatan disulfida antar MHC ini menciptakan banyak ikatan silang antar rantai protein tersebut, sehingga terbentuk agregat dan gel yang kokoh (Nishimura, et al., 1996).

Selama perjalanan dari TPI menuju laboratorium, ikan dimasukkan dalam *ice box* untuk mempertahankan kesegarannya. Asam askorbat dan bahan kimia lainnya yang digunakan adalah bahan kimia berkualitas analisis dari Merck (Jerman).

Ekstraksi protein miofibril pada ikan mata besar (Subagio, et al., 2004)

Protein miofibril dari sampel ikan disiapkan dengan memisahkan daging dari tulang dan kulit ikan. Daging bersih selanjutnya dimixer dengan larutan NaCl 0,5% dalam buffer phospat 0,1 M pH 7 (suhu 4 - 6 °C) dengan volume 3 kali berat daging selama 3 menit. Hasilnya disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Filtrat didekantasi dan endapan dimixer kembali dan diperlakukan sama seperti langkah di atas. Selanjutnya endapan dilewatkan pada kain saring rangkap empat untuk memisahkan duri maupun protein stroma yang lainnya. Endapan yang melewati kain saring selanjutnya dimixer dengan buffer yang sama dengan pencucian pertama dan kedua, dan disentrifus ulang. Endapan yang dihasilkan adalah protein myofibril, dan disimpan dalam freezer (-20°C) sampai dibutuhkan untuk dianalisis.



Gambar 1. Mekanisme peranan asam askorbat dalam pembentukan ikatan disulfide pada protein (Nishimura et al.,1996)

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan asam askorbat terhadap kualitas gel miofibril ikan mata besar. Hasil penelitian ini diharapkan berguna untuk pengembangan dan pemanfaatan lebih lanjut dari ikan mata besar dan ikan inferior lainnya sebagai sumber protein pangan.

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang digunakan Ikan Mata Besar *(S. crumenophthalmus)* dari Samudra Indonesia yang diperoleh di tempat pelelangan ikan (TPI) Pantai Puger, Kabupaten Jember Propinsi Jawa Timur.

Aplikasi asam askorbat pada gel miofibril ikan mata besar

Miofibril hasil dari pencairan diambil sebanyak 10 gram yang dimasukkan ke dalam wadah film, dan kemudian ditambahkan 3 ml larutan asam askorbat pada berbagai konsentrasi (0%, 0.1%, 0.2%, 0.35 dan 0.4%). Pencampuran bahan dengan asam askorbat dilakukan dengan spatula dalam waktu 30 menit. Setelah bahan tercampur homogen, wadah film dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu 40°C selama 20 menit. Kemudian dilanjutkan pemanasan dengan suhu 90°C selama 20 menit Anonim, 2003b). Gel didinginkan dan disimpan dalam lemari pendingin (4-6 °C) selama satu hari sebelum dianalisis.

Susut masak dan daya ikat air

Susut masak gel dianalisis berdasarkan persentase pengurangan berat setelah dipanaskan. Sedangkan daya ikat air (WHC) dihitung berdasarkan kadar air gel yang dianaliis menggunakan metode oven (Sudarmadji, et al., 1984).

Tekstur gel

Pengukuran textur gel dilakukan dengan Rheotex (Ogawa Seiki Co., LTD, Tokyo Japan). Gel ikan yang telah ditiriskan diukur teksturnya berdasarkan besarnya gaya yang diperlukan untuk menekan gel dengan jarum Rheotex standar sedalam 7 mm. Pengukuran diulangi sebanyak 3 (tiga) kali pada tempat yang berbeda, diperoleh nilai reratanya.

Perubahan berat molekul protein dengan elektroforesis

Analisis perubahan berat molekul (BM) protein dilakukan dengan SDS-PAGE pada konsentrasi akrilamid 12% yang dilakukan pada Mini-Protean II Electrophoresis System (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Gel diwarnai dengan Coomassie blue R-250. Sampel diambil dari bahan yang telah dilarutkan dalam larutan urea (8 M) dalam SDS 1%. Berat molekul protein dihitung berdasarkan perbandingan Rf sample dengan marker protein yang berasal dari Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo), yaitu kit penciri protein ber BM rendah yang terdiri atas:: serum albumin (66,0 kD), ovalbumin (45,0 kD), Carbanic anhidrase (29,0 kD), dan lysozime (14,2 kD).

Struktur mikroskopis

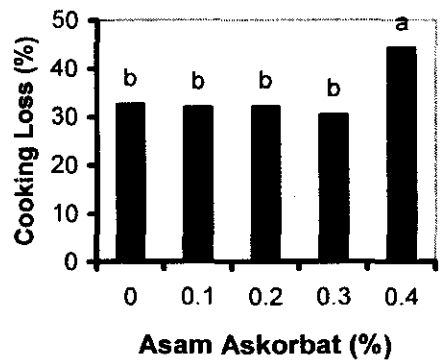
Gel yang telah dikeringkan dengan *freezed dryer* dicelupkan ke dalam paraffin sampai meresap seluruhnya ke dalam bahan. Setelah kering, bahan yang telah dilapisi oleh paraffin diiris tipis-tipis dan ditetesi larutan coomassie blue secara berlebihan. Bahan kemudian diamati struktur mikroskopisnya dengan menggunakan mikroskop binokuler bermerk Jeulin dengan model XTX dengan perbesaran 20 kali. Struktur mikroskopis yang dihasilkan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Susut masak gel

Susut masak digunakan untuk mengetahui besarnya kehilangan berat dari gel miofibril ikan mata besar selama proses pemanasan. Selama proses pemanasan terjadi peristiwa antara lain, pengeluaran air dalam sistem gel miofibril ikan sebagai akibat dari pengerutan sistem gelnya, dan selanjutnya air tersebut hilang menguap akibat proses pemanasan atau penirisan setelah pencairan gel.

Hasil analisis menunjukkan bahwa pada penambahan asam askorbat dengan konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3% dan 0,4%, susut masak-nya adalah 32,6 ± 2,5%, 31,9 ± 3,9%, 32,2 ± 5,1%, 29,6 ± 1,1% dan 40,0 ± 9,1% (Gambar 2). Ini berarti bahwa pada penambahan asam askorbat sampai dengan 0,3% tidak terjadi perubahan yang nyata pada susut masak gel. Namun setelah penambahan asam askorbat 0,4% terjadi peningkatan susut masak yang mencolok. Pembentukan ikatan disulfida antara MHC-MHC dalam gel miofibril ikan mata besar menyebabkan pembentukan struktur tiga dimensi menjadi kokoh. Namun bila pembentukan ikatan disulfida antara MHC-MHC sangat besar, maka akan diikuti dengan pengerutan matriks gel, sehingga apabila pengerutan ini terjadi secara berlebihan maka banyak air yang terperangkap dalam gel miofibril ikan tersebut keluar dari permukaan gel dan hilang menguap atau tertiriskan sewaktu pencairan gel. Hal ini menyebabkan nilai susut masak pada gel miofibril ikan tersebut semakin tinggi. Gejala ini didukung oleh adanya perubahan WHC, tekstur dan BM protein myofibril

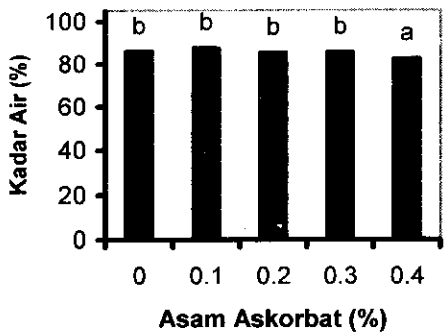


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi asam askorbat terhadap cooking loss dari gel myofibril ikan mata besar

Daya ikat air atau WHC

Penambahan asam askorbat pada gel miofibril ikan Mata Besar dapat mempengaruhi WHC yang ditentukan berdasarkan kadar air. Hasil analisa menunjukkan bahwa pada penambahan asam askorbat pada konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3 % dan 0,4% menunjukkan kadar air sebesar 86,1 ± 0,4%, 87,7 ± 4,70%, 85,5 ± 0,5%, 85,7 ± 0,6%, dan 82,7 ± 2,1% seperti pada Gambar 3. Dari hasil tersebut terlihat bahwa penambahan asam askorbat sampai dengan 0,3% tidak terjadi perubahan yang nyata pada WHC gel. Namun WHC gel menurun secara nyata dengan penambahan 0,4% asam askorbat.

Gejala ini sesuai dengan data susut masak efek pemberian asam askorbat menjadi berlebihan jika ditambahkan lebih dari 0,4%. Pada konsentrasi ini, pembentukan ikatan disulfida antara MHC-MHC akibat pengaruh asam askorbat menjadi sangat besar, sehingga akan diikuti dengan pengerutan matriks gel. Pengerutan ini ini akan diikuti dengan terdesaknya air dalam matriks untuk keluar, hingga WHC gel menjadi turun.



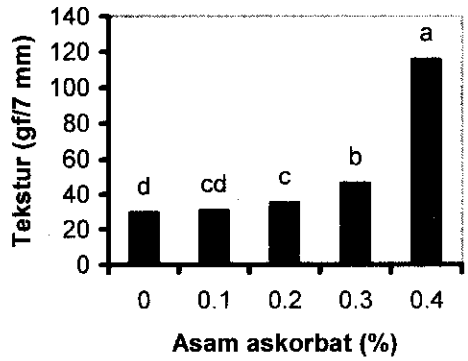
Gambar 3. Pengaruh konsentrasi asam askorbat terhadap WHC yang diekspresikan dengan kadar air dari gel miofibril ikan mata besar

Tekstur

Parameter tekstur gel biasanya dipaparkan dalam istilah keempukan dan kekerasannya. Perhitungan nilai keempukan atau kekerasan gel miofibril ikan mata besar ini dilakukan dengan menggunakan alat Rheotex yang dinyatakan dengan gram force per 7 mm, sehingga semakin besar nilainya berarti gel daging ikan tersebut semakin keras.

Tekstur gel miofibril ikan mata besar setelah ditambah dengan asam askorbat, yaitu pada penambahan 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3% dan 0,4% masing-masing sebesar 29,9 ± 1,9 gf/7 mm, 31 ± 0,3 gf/7 mm, 35,4 ± 0,4 gf/7 mm, 46,7 ± 1,5 gf/7 mm, dan 115,7 ± 3,2 gf/7 mm seperti yang terlihat pada Gambar 4. Dari gambar tersebut terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi asam askorbat yang digunakan, maka kekerasan gel miofibril ikan semakin tinggi. Hal ini disebabkan oleh adanya aktivitas asam askorbat dalam miofibril ikan tersebut. Dalam hal ini asam askorbat dalam gel miofibril ikan berperan sebagai reduktor dalam pembentukan jaringan disulfida. Jaringan disulfida dalam gel miofibril yang semula berantai MHC-SH direduksi oleh asam askorbat menjadi radikal MHC-S•. Hal ini menyebabkan terbentuknya jaringan disulfida baru menjadi 1/2(MHC-S-S-MHC) (Nishimura, et al., 1996). Dengan semakin meningkatnya konsentrasi asam askorbat, diduga semakin banyak pula jaringan disulfide baru yang terbentuk. Akibatnya tekstur yang dihasilkan oleh gel miofibril ikan menjadi semakin mengeras.

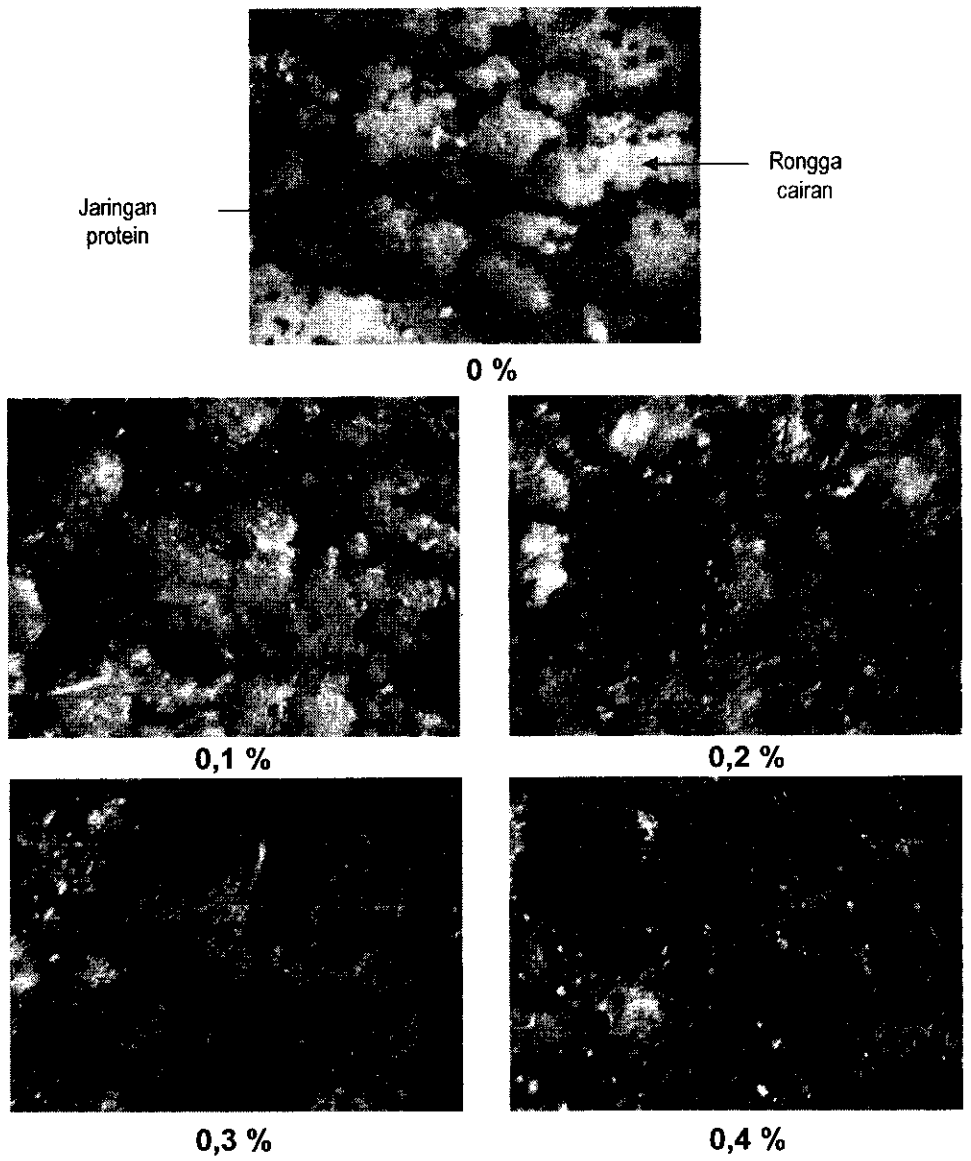
Hal ini dapat dibuktikan dalam analisis struktur mikroskopis. Gambar 5 memperlihatkan bahwa sejalan dengan penambahan asam askorbat, maka struktur matrik jaringan gel miofibril ikan semakin mengecil atau struktur dindingnya menjadi semakin menebal. Semakin mengecil atau menebalnya struktur matrik jaringan gel miofibril memperlihatkan semakin kuat dan kokohnya struktur matrik jaringan pada gel miofibril ikan tersebut. Oleh karena itu, tekstur gel yang dihasilkan juga pun semakin keras.



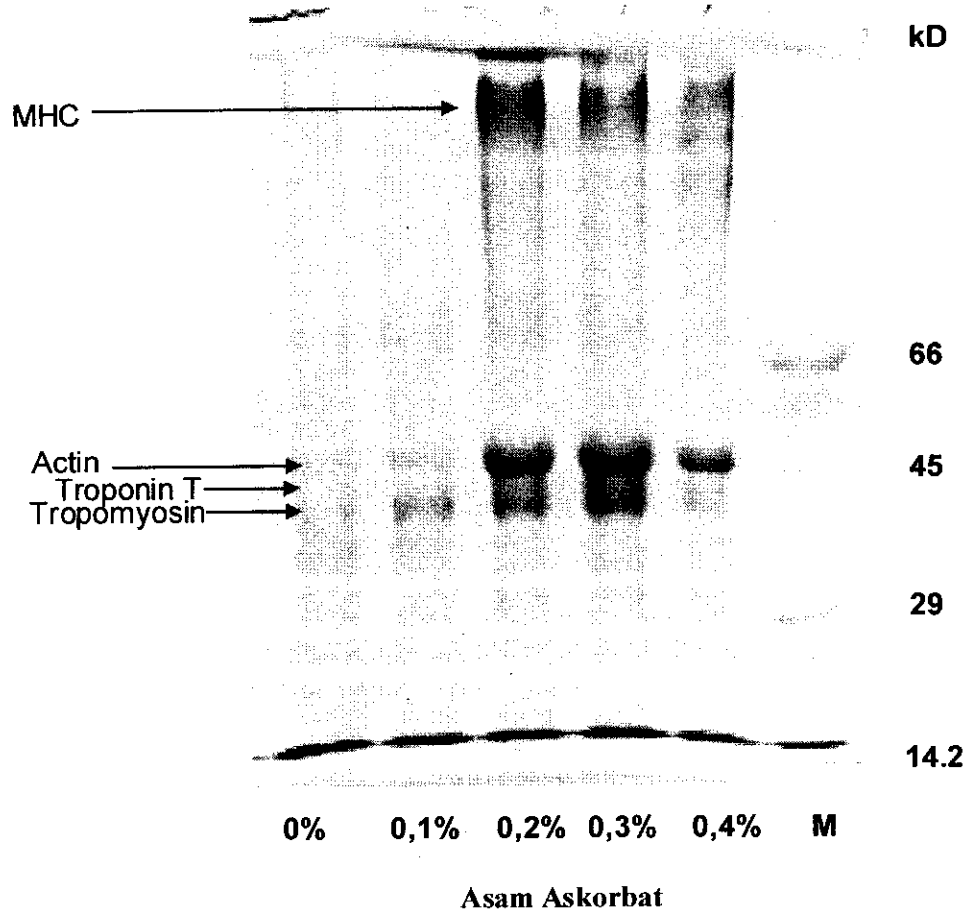
Gambar 4. Pengaruh konsentrasi asam askorbat terhadap tekstur dari gel miofibril ikan mata besar.

Perubahan berat molekul protein

Hasil elektroforesis pada gel miofibril ikan setelah ditambah dengan asam askorbat, yaitu pada penambahan 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3% dan 0,4% masing-masing seperti yang terlihat pada Gambar 6. Semakin besar penambahan konsentrasi asam askorbat pada gel miofibril ikan, maka bentuk band hasil visualisasi elektroforesis semakin memudar. Aktivitas asam askorbat dalam membentuk jaringan disulfida pada gel miofibril ikan terlihat jelas pada MHC (*Myosin Heavy Chain*) hasil elektroforesis. Dalam hal ini asam askorbat dalam gel miofibril ikan berperan sebagai reduktor dalam pembentukan jaringan disulfida. Jaringan disulfida dalam gel miofibril yang semula berantai MHC-SH direduksi oleh asam askorbat menjadi MHC-S. Hal ini menyebabkan terbentuknya jaringan disulfida baru menjadi 1/2(MHC-S-S-MHC) yang menyebabkan terjadinya perubahan protein pada gel miofibril ikan. Bentuk, protein miofibrilar yang terdiri dari aktin dan miosin menjadi jaringan baru dengan ikatan 1/2(MHC-S-S-MHC), yang merupakan hasil polimerisasi miofibril ikan. KOndisi ini akan meningkatkan nilai BM miofibril ikan (Nishimura, et al., 1996).



Gambar 5. Struktur mikroskopis dari gel miofibril ikan Mata Besar pada berbagai konsentrasi asam askorbat (perbesaran 20X).



Gambar 6. SDS-PAGE dari fraksi protein miofibril protein dari gel miofibril ikan Mata Besar. MHC: Myosin Heavy Chain; M: Marker

Gambar 6 menunjukkan pada konsentrasi 0%, 0,1% dan 0,2%, pita-pita protein miofibril (MHC) masih terlihat dengan jelas; sedangkan pada konsentrasi 0,3% dan 0,4% pita-pita protein (MHC) tersebut mulai memudar. Pudarnya pita-pita tersebut disebabkan oleh peningkatan nilai BM pada miofibril ikan. Semakin bertambahnya asam askorbat pada gel tersebut maka pembentukan jaringan 1/2(MHC-S-S-MHC) semakin meningkat, sehingga nilai BM miofibril ikan tersebut semakin bertambah. Dalam hal ini fungsi elektroforesis adalah memvisualisasikan protein dengan nilai BM pada kisaran di bawah 200 kD. Bila BM telah melebihi kisaran nilai kemampuan gel elektroforesis, maka pita MHC-S-S-MHC tidak dapat terdeteksi pada hasil elektroforesis.

KESIMPULAN

Penambahan asam askorbat pada gel miofibril ikan Mata Besar menyebabkan terbentuknya jaringan disulfida baru antar MHC (MHC-S-S-MHC) yang terlihat dari hasil SDS-PAGE di mana pita MHC pada elektroforesis menjadi semakin memudar seiring dengan penambahan konsentrasi asam askorbat. Kejadian ini menyebabkan terbentuknya struktur tiga dimensi dengan ikatan MHC-S-S-MHC yang lebih kokoh dan kuat yang ditandai dengan struktur matrik jaringan semakin mengecil dengan dinding matrik jaringan yang menebal.

Perubahan ini menyebabkan peningkatan kekerasan gel yaitu pada penambahan asam askorbat 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3% dan 0,4% dengan nilai tekstur gel masing-masing sebesar 29,9 ± 1,9 gf/7 mm, 31 ± 0,3 gf/7 mm, 35,4 ± 0,4 gf/7 mm, 46,7 ± 1,5 gf/7 mm, dan 115,7 ± 3,2 gf/7 mm berturut-turut. Namun demikian, penambahan asam askorbat yang berlebihan, yaitu pada konsentrasi 0,4% menyebabkan pembentukan ikatan disulfida antara MHC-MHC menjadi sangat besar, sehingga akan diikuti dengan pengerutan matriks gel. Pengerutan ini menyebabkan peningkatan susut masak dan penurunan daya ikat air dari gel miofibril.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional RI yang telah memberikan dana pada penelitian ini lewat Hibah Bersaing XI tahun anggaran 2004/2005.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1998. Jawa Timur dalam Angka, Biro Pusat Statistik Jawa Timur, Surabaya.

Anonim, 2003a. Species Summary of Fish, http://www.ichtyonb1.mnhn.fr, 7/2/2003.

Anonim, 2003b. Surimi, http://www.agrolink.moa.my/, 7/2/2003.

Fardiaz, S., 1995. Pengembangan industri pengolahan hasil perikanan di Indonesia: Tantangan dan penerapan sistem jaminan mutu. Bulletin Teknologi dan Industri Pangan. **6**: 65-73.

Nishimura, K., Goto, M., and Mano, J., 1996. Participation of the Superoxide Radical in the Beneficial Effect of Ascorbic Acid on Heat-induced Fish Meat Gel., Biosci. Biotech. Biochem., 60 (12), 1966-1970.

Shahidi, F., 1998. Functional seafood products. In Shibamoto, T.; Terao, J. and Osawa, T. eds., Functional Foods for Disease Prevention II Medicinal Plants and other Foods. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. **702**, pp 29 - 49.

Subagio, A., Windrati, W., S., Fauzi, M., and Witono, Y., 2004. Karakterisasi protein miofibril dari ikan kuniran (Upeneus moluccensis) dan ikan mata besar (Selar crumenophthalmus). J. Teknol. Indust. Pangan, **15** (1), 70-78.

Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi, 1984, Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty, Yogyakarta.