

PENENTUAN DERADJAT PEMBUSUKAN
PADA UDANG

P. Soedigdo, Rochestri Ijad dan Tan Hwie Liep^{*)}

R I N G K A S A N

Pembusukan pada udang adalah suatu akibat kerdja enzima² hidrolitik berasal dari udang sendiri dan djuga dari bakteri² jang ada pada udang.

Hasil penelitian menjatakan bahwa aktivitas spesifik SH-protease udang ber-angsur² menurun selama proses pembusukan, sehingga sifat ini baik untuk dipakai sebagai kriteria pembusukan udang. Aktivitas enzima ditentukan pada 37°C selama 20 menit dengan 1% kasein dalam 0,1 M buffer fosfat pH 8 sebagai substrat dan sisteina (0,02 M) sebagai aktivator. Sebagai larutan enzima dipakai homogenat udang dalam 0,1 M buffer fosfat pH 8.

Berdasarkan atas sifat penurunan aktivitas spesifik SH-protease dan kenaikan pH dan kadar trimetilamina udang pada proses pembusukan, maka dapatlah disusun suatu penggolongan deradjat kesegaran udang. Hal ini dapat penting untuk keperluan² dalam praktek.

A B S T R A C T

Spoilage of shrimps is largely caused by enzyme action especially by shrimp proteases in addition to microbial action which is also enzymatic in nature.

^{*)} Bagian Kimia, Seksi Biokimia, Institut Teknologi Bandung.

It was found that when spoilage is in progress the specific activity of the shrimp SH-proteases is remarkably decreased. It appeared that this is a suitable criterion for the determination of the degree of spoilage. Enzyme activity determinations were carried out at 37°C with 1% of casein in 0.1 M phosphate buffer of pH 8 as the substrate and cysteine (0.02 M) as the activator. Shrimp homogenate was used as the enzyme solution which was prepared in 0.1 M phosphate buffer of pH 8 at 0 - 4°C.

Based on the decrease of SH-protease activity and on the increase of pH and volatile base (trimethylamine etc.) content a classification of the freshness of shrimps can be made, which might be useful for practical purposes.

PENGANTAR

Bagi Indonesia, udang merupakan salah satu hasil laut jang sangat penting. Selain untuk konsumsi dalam negeri sebagai bahan makanan jang kaya protein, udang djuga merupakan bahan ekspor jang menghasilkan banjak devisa bagi negara.

Mengingat bertambahnja penduduk jang sangat tjepat tiap2 tahunnja, dapatlah diduga bahwa penangkapan udang dan ikan akan diperbesar. Ini menimbulkan banjak masalah diantaranya pengawetannja. Disamping ini nantinja akan terasa sekali perlunja ada tjara2 penetapan deradjat pembusukannja. Maklumlah didaerah tropik ini gedjala2 pembusukan pada ikan dan udang mulai tampak dalam waktu sekitar 5 djam pada suhu 30°C. Pendinginan pada sekitar 0°C atau lebih rendah lagi, adalah salah satu djalan untuk memperpanjang kesegarannja. Adanja tjara2 analisa seperti jang dimaksud diatas tadi, nantinja orang dapat menentukan apakah udang jang bersangkutan masih dapat dikonsumsi atau diawetkan sebagai bahan makanan.

Disini akan dilaporkan hasil2 penelitian kami dalam rangka mentjari tjara2 analisa jang seperti tersebut diatas jang sesuai untuk keadaan di Indonesia.

BAHAN2 DAN TJARA2

Semua zat kimia jang dipakai adalah dari deradjat analitik, ketjuali djika disebut lain.

Udang mentah segar diperoleh dari perdagangan dan dibawa ke-laboratorium se-tjepatnja dalam keadaan dingin pada sekitar 0°C . Pandjang udang adalah antara 5 - 7 cm.

Pengukuran pH udang dilakukan dengan Beckman Zeromatic pH-meter atas homogenat udang jang masih segar. Ini dibuat dengan menghomogenisasi 10 gram daging udang (kepala dan kulitnja dibuang) selama 4 menit dengan 100 ml air didalam Warring Blender.

Penentuan trimetilamina (TMA) dilakukan dengan alat Conway sebagai berikut. Ruang titrasi diisi dengan 1 ml H_3BO_3 4% dan 1 tetes indikator Tashiro (0,0822 gram metilin-biru dan 0,1252 gram metil-merah dilarutkan dalam 100 ml etil alkohol 95%). Bagian sebelah kiri diisi dengan 1 ml homogenat jang mengandung 0,1 gram daging udang jang dibuat seperti untuk pengukuran pH. Bagian kanan diisi dengan 1 ml larutan NaOH 40%. Setelah alat ditutup, kedua larutan ditjampur dan kemudian ditaruh pada 37°C selama $2\frac{1}{2}$ djam. Achirnja larutan di-ruang titrasi, dititrasi dengan 0,1046 N HCl lewat mikroburet sampai warna indikator mendjadi ungu.

Penentuan TMA dengan tjara destilasi dilakukan sebagai demikian. Labu destilasi (500 ml) diisi dengan 100 ml homogenat daging udang jang mengandung 10 gram daging. Ini dilakukan setjara kwantitatip dengan pembilasan. Setelah ditambahkan 10 ml NaOH 40% dan batu didih, labu segera ditutup dan destilasi dimulai. Udjung pendingin Liebig harus dimasukkan kedalam 15 ml asam borat 4% jang telah dibubuhi beberapa tetes indikator Tashiro. Setelah destilasi berdjalan 10 menit diberhentikan. Udjung pendingin dibilasi dengan air, lalu larutan dititrasi dengan 0,05 N HCl sampai timbul warna ungu. Kadar TMA ditetapkan dalam mg NH_3 per 100 gram daging udang.

Larutan enzima udang diperoleh dengan djalan menghomogenisasi 5 gram daging udang dalam Warring Blender selama 4 menit dalam 100 ml 0,1 M larutan buffer fosfat pH 8 pada suhu $0^{\circ} - 4^{\circ}\text{C}$. Homogenat jang didapat disentrifuga dalam International Refrigerated Centrifuge selama 45 menit pada 2610 g dan 0°C . Supernatan jang diperoleh jang masih segar dipakai sebagai larutan enzima. Ini disimpan dulu dilemari es sampai dipakai.

Larutan buffer fosfat 0,1 M, pH 8, dibuat dari 0,805 gram KH_2PO_4 dan 13,396 gram Na_2HPO_4 jang dilarutkan dalam air sampai 500 ml.

Substrat kasein 1% (b/v) dibuat dari 1,00 gram kasein (E. Merck) dalam 100 ml 0,1 M buffer fosfat pH 8 jang dipanasi didalam Erlenmeyer selama 30 menit didalam air mendidih. Setelah dingin pH-nja dibuat 8 lagi (tambah 30% NaOH) dan volumenja dibuat 100 ml.

Penentuan aktivitas non-SH-protease dilakukan dengan menginkubasi 1 ml substrat dengan 1 ml larutan enzima udang

pada 37°C. Pada selang waktu tertentu reaksi dihentikan dengan penambahan 3 ml 5% asam trichlorasetat (TCA) dingin. Setelah didiamkan 30 menit, disaring. Kemudian absorpsi filtrat ditetapkan dalam Beckman DU-2 spektrofotometer pada 276 nm setelah dientjerkan seperlunya. Untuk waktu 0 menit diambil 1 ml larutan enzima yang ditjampur dengan 3 ml 5% TCA, baru kemudian ditambahkan 1 ml substrat. Setelah didiamkan dan disaring, filtratnya dikerdjakan seperti diatas. Selisih absorpsi antara kedua hasil diatas menunjukkan aktivitas enzima dalam unit aktivitas.

Penentuan aktivitas SH-protease dilakukan seperti pada non-SH-protease, ketjuali pada larutan enzima ditambahkan L-sisteina-HCl yang dihitung demikian sehingga kadarnya pada volume akhir tjampuran reaksi nantinya adalah 0,02 M.

Aktivitas spesifik enzima didefinisikan sebagai aktivitas enzima dalam unit aktivitas per mg protein larutan enzima.

Penentuan kadar protein dilakukan sebagai berikut: 1 ml larutan protein yang hendak diperiksa, diendapkan proteinnja dengan penambahan 1 ml 20% TCA dan didiamkan sekitar 5 menit. Lalu disentrifuga 25 menit didalam sentrifuga klinik. Kemudian endapan dilarutkan kedalam 5 ml 3% NaOH dan setelah ini ditambahkan 1 ml pereaksi biuret dan didiamkan sekitar 15 menit. Akhirnya absorpsinya diukur pada 545 nm dalam Beckman model B spektrofotometer. Untuk standar protein diambil 1 ml larutan yang mengandung 5 mg serumalbumina yang kemudian dikerdjakan seperti diatas. Sebagai blanko dipakai 5 ml 3% NaOH yang ditambahkan 1 ml pereaksi biuret. Pereaksi ini dibuat menurut prosedur dari Henry (1).

Larutan pepton yang dipakai dalam penentuan jumlah jasad renik dibuat sebagai berikut: 2 gram pepton dan 10 gram NaCl dilarutkan kedalam 1750 ml air. Setelah pH-nya dibuat 7,0 volume akhir dibuat 2 liter, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 25 menit pada 15 psi dan 121°C.

Media agar nutrisi dibuat dengan djalan melarutkan sedikit demi sedikit 23 gram bacto agar nutrisi kedalam 2 liter air panas lalu disaring melalui kain. Larutan ini dimasukkan kedalam tabung2 reaksi sebanjak 12 - 13 ml, kemudian disterilkan dalam autoklaf seperti diatas. Adapun pH akhir adalah 6,8. Agar bacto tersebut terdiri dari 3 gram ekstrak bacto daging sapi, 5 gram bacto pepton, dan 15 gram bacto agar.

EKSPERIMEN DAN HASIL

1. Uji organoleptik

Uji organoleptik merupakan langkah pertama dalam penilaian kesegaran udang. Untuk ini dilakukan pengamatan mengenai perubahan2 pada warna, bau serta keadaan daging. Dari hasil2

pengamatan ini dapatlah kami adakan penggolongan2 udang sebagai demikian:

- A. Udang segar; warna abu2 dan praktis tidak berbau.
- B. Udang kurang segar; masih dapat dimakan; warna merah muda dan mulai timbul bau kearah pembusukan.
- C. Udang telah mengalami pembusukan; tidak dapat dimakan lagi, warna merah dan mulai berbau busuk.
- D. Udang jang benar2 busuk; tidak dapat dimakan; warna merah dan berbau busuk.

2. Penentuan pH

Penentuan dilakukan atas homogenat udang menurut tjara2 jang diutarakan di-bab Bahan2 dan Tjara2. Makin busuk udang itu ternjata makin tinggi pula narga pH-nja. Kemungkinan besar ini disebabkan olen terbentuknja basa2 (amina2, ammonia dsb.) pada proses pembusukan. Mengingat homogenat daging mempunjai sifat buffer, maka kenaikan pH akibat terbentuknja basa2 adalah kurang besar dan djuga kurang memuaskan untuk dipakai sebagai kriteria pembusukan karena reproduksinja rendah. Walaupun demikian untuk menjokong pengudjian dapatlan disusun hubungan antara pH homogenat dan golongan kesegaran (tabel 1). Perlu diketahui banwa kadang2 terdjadi sedikit penjimpangan2 dari apa jang tertulis pada tabel.

Tabel 1. Hubungan pH homogenat udang dan golongan kesegaran udang. Untuk keterangan lebih lanjut, harap linat pada teks.

Golongan kesegaran	pH homogenat
A	7,5 - 7,7
B	7,7 - 7,9
C	7,9 - 8,1
D	> 8,1

3. Penentuan kadar TMA

a. *Metoda difusi mikro.* Ini dilakukan dengan alat Conway menurut prosedur di-bab Bahan2 dan Tjara2. Ternjata hasilnja menundjukkan bahwa makin djauh proses pembusukan, makin bertambahlah kadar TMA-nja. Oleh sebab itu dengan tjara tersebut dapatlah diikuti proses pembusukannya (tabel 2). Dari tabel 2

terlihat bahwa udang dari golongan A sesudah $3\frac{1}{2}$ djam penjin-
pangan pada suhu 30°C telah mendjadi golongan B dan sesudah $7\frac{1}{2}$
djam sudah tidak dapat dimakan lagi.

*Tabel 2. Kadar TMA udang setelah mengalami penjin-
pangan pada 30°C .*

Penjin- pangan (djam)	Kadar TMA sebagai mg NH_3 /100 g udang	Golongan
0	86	A
$3\frac{1}{2}$	184	B
$7\frac{1}{2}$	288	C
22	565	D

Dari pengumpulan hasil2 penentuan kadar TMA udang dari
berbagai deradjat kesegaran, dapatlah disusun hubungan antara
golongan kesegaran udang dan kadar TMA-nja (tabel 3).

*Tabel 3. Hubungan antara golongan kesegaran udang
dan kadar TMA-nja, ditentukan dengan alat
Conway.*

Golongan udang	Kadar TMA dalam mg NH_3 /100 g udang
A	< 88
B	88 - 184
C	184 - 288
D	> 288

b. Metoda destilasi. Ini dikerdjakan setjara makro dengan
prosedur2 jang telah diuraikan di-bab Bahan2 dan Tjara2. Ter-
njata kadar TMA-nja dengan metoda ini lebih besar dari pada
dengan tjara difusi-mikro. Mengingat homogenat udang jang di-
periksa pada metoda makro adalah lebih banjak, maka setjara

teoretis ini lebih representatif. Hanya sajangan ini kurang praktis.

Hubungan antara golongan kesegaran udang dan kadar TMA-nja jang dilakukan dengan tjara destilasi-makro tertulis pada tabel 4.

Tabel 4. Hubungan antara golongan kesegaran udang dan kadar TMA-nja, ditentukan lewat destilasi-makro.

Golongan udang	Kadar TMA dalam mg NH ₃ /100 g udang
A	< 215
B	215 - 240
C	240 - 280
D	> 280

4. Penentuan aktivitas protease

Proses pembusukan pada udang adalah suatu proses biokimia sebagai akibat dari kerdja enzima2 hidrolitik dari pada udang sendiri dan djuga dari enzima2 bakteri jang ada pada udang. Protease2 merupakan penjebab utama dan oleh sebab itu disini hanya enzima2 itulah jang akan diselidiki dan hasilnja akan dihubungkan dengan golongan kesegaran udang.

a. Penentuan aktivitas SH-protease. Ini dilakukan menurut prosedur2 jang telah diuraikan di-bab Bahan2 dan Tjara2. Lama inkubasi enzima dan substrat adalah 20 menit pada 37°C. Hasilhasilnja dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Aktivitas SH-protease dari pada udang jang telah mengalami penjimpanan pada 30°C.

Penjimpanan (djam)	Protein (mg/ml)	Aktivitas (satuan)	Aktivitas spesifik	Golongan udang
0	4,66	0,088	1,89	A
4	6,94	0,082	1,18	B
7	5,98	0,052	0,87	C

Djelaslah dari tabel diatas bahwa aktivitas spesifik SH-protease udang dapat dipakai sebagai kriteria pembusukan. Makin djauh proses pembusukan maka makin berkurangnya aktivitas spesifiknja.

b. *Penentuan aktivitas non-SH-protease.* Ini dikerdjakan menurut prosedur2 di-bab Bahan2 dan Tjara2, dengan waktu inkubasi 20 menit. Hasilnja tertulis pada tabel 6.

Tabel 6. *Aktivitas non-SH-protease dari pada udang jang telah mengalami penjimpanan pada 30°C.*

Penjimpanan (djam)	Protein (mg/ml)	Aktivitas (satuan)	Aktivitas spesifik	Golongan udang
0	4,66	0,022	0,47	A
4	6,94	0,024	0,34	B
7	5,98	0,084	1,40	C

Aktivitas non-SH-protease tidak baik untuk dipakai sebagai kriteria pembusukan, karena kadang2 turun dan kadang2 naik. Mengenai hal ini masih belum djelas keterangannja.

5. *Penentuan djumlah djasad renik.*

Metoda mikrobiologis ini masih sering dipakai untuk menetapkan keadaan sterilitas dari pada bahan2 makanan jang diawetkan. Disini akan ditjoba apakah metoda tersebut dapat pula dipakai sebagai kriteria dalam penggolongan udang.

Untuk dapat mengikuti proses pembusukan setjara perlahan-lahan maka sekitar 1 kg udang mentah disimpan dilemari es pada 3 - 4°C. Pada waktu2 0, 2, 4 dan 6 hari dibuat homogenat dari berbagai pengentjeren. Ini dilakukan dalam Warring blender steril dengan larutan pepton - NaCl (lihat bab Bahan2 dan Tjara-tjara). Dari tiap2 pengentjeren homogenat diambil 1 ml dan dimasukkan kedalam tjawan petri steril. Kemudian dituangkan media nutrisi agar jang telah dilumer terlebih dahulu kedalam tjawan petri tadi dan ditjampur baik2. Setelah agar mendjadi keras, tjawan2 diinkubasi selama 3 x 24 djam pada 30°C.

Untuk memeriksa kesterilan larutan pepton dan agar nutrisi, maka 1 ml larutan pepton tersebut ditjampur dengan media agar nutrisi dan dikerdjakan seperti diatas. Koloni2 bakteri jang timbul dihitung dengan alat pentjatjah, sehingga djumlah bakteri per mg udang dapat ditetapkan.

Dari hasilnja (tabel 7) ternjata bahwa pertumbuhan bakteri berdjalan tjukup tjepat setjara eksponensiil dalam lemari es, sehingga sesudah 6 hari udang pada pertjobaan tersebut sudah tidak dapat dikonsumsi lagi. Ini tentu sadja bergantung pada keadaan djumlah bakteri pada permulaan jang bergantung terutama pada kebersihan udang.

Pada dasarnya metoda mikrobiologis dapat djuga dipakai sebagai kriteria penjokong dalam menentukan golongan kesegaran udang. Tetapi oleh sebab pengerdjaannja memakan waktu sampai 4 hari sedangkan deviasinja besar, maka metoda ini kurang praktis dan tidak diandjurkan.

Tabel 7. Djumlah bakteri pada proses pembusukan udang jang disimpan pada suhu 3 - 4°C.

Penjimpanan (djam)	Rata2 djumlah bakteri x 10 ⁻⁸	Djumlah pertjobaan	Golongan
0	0,5 (0,1 - 1,0)	3	A
2 x 24	14,4 (0,9 - 28,0)	3	B
4 x 24	266,3 (105 - 514)	3	C
6 x 24	4236 (3690 - 8640)	3	D

PEMBITJARAAN

Dari hasil2 penelitian dapat disimpulkan bahwa metoda2 biokimia jang dilakukan disini merupakan metoda2 jang baik untuk menetapkan deradjat pembusukan pada udang, hal mana ini sangat diperlukan untuk Indonesia. Aktivitas spesifik SH-protease udang ternjata sangat peka terhadap proses pembusukan, sehingga merupakan kriteria jang baik dalam penetapan deradjat pembusukan udang. Mengenai sebab2nja masih belum djelas.

Djuga kadar TMA-nja merupakan kriteria jang memuaskan. Baik metoda difusi-mikro maupun metoda destilasi-makro dengan persjaratannja masing2 dapat digunakan. Perubahan pH udang pada proses pembusukan ternjata kurang besar, sehingga kurang peka untuk dipakai sebagai kriteria pembusukan.

Demikian pula tjara2 mikrobiologis kurang baik dan kurang praktis untuk dipakai dalam penetapan deradjat pembusukan. Dari hasil2 penelitian mikrobiologis dapat dimengerti bahwa djumlah bakteri pada udang segar adalah sangat menentukan tjepat pembusukan. Metoda2 jang dibitjarakan disini telah diudji dengan hasil memuaskan pada proses pengawetan dan pada usaha untuk memperpanjang kesegaran udang (2) (3).

KEPUSTAKAAN

1. Henry, R.J., (1965), Clinical Chemistry, Harper & Row, Publishers, halaman 182.
2. Tan Hwie Liep, (1968), Penelitian kearah memperpanjang keawetan udang, Tesis Sardjana, Laboratorium Biokimia ITB, Bandung.
3. Soedigdo, P., dan Rochestri Ijad, (1972), Perubahan biokimia pada udang jang telah mengalami penjinaran dengan sinar gamma, Madjalah BATAN, sedang ditjetak.

(Diterima 9 Djuni 1972)
