POLIFENOL OKSIDASE DARI SARI BUAH MARKISA (*Passiflora sp*)

Zulkarnain Chaidir

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas

INTISASRI

Polifenol oksidase (PPO) telah diekstrak dan difraksinasi dari sari buah markisa (*Passiflora sp*). PPO menunjukkan aktifitas untuk substrat pirogalol 189,7 unit/ml. pH optimum untuk PPO sari buah markisa menggunakan substrat pirogalol adalah 5. Pada suhu > 37,5 ^{0}C aktifitas akan hilang. Pemanasan selama 30 menit pada suhu 37,5 ^{0}C aktifitas enzim maksimum.

ABSTRACT

Polyphenol oxidase (PPO) was extracted from. Paison fruit juice (*Passiflora sp*). PPO showed activity to pyrogalol were 189.7 unit/ml. the optimum pH for the PPO was on substrates pyrogalol. Heat inactivation studies showed temperature > 37.5 ^{0}C resulted in loss of enzyme activity. Heating for 30 min at 37.5 ^{0}C did not cause a significant lass of enzymatic activity.

PENDAHULUAN

Budidaya tanaman markisa jenis konyal (*Passiflora sp*) telah lama diusahakan oleh para petani Alahan Panjang Kabupaten Solok, Sumatera Barat, walaupun dalam jumlah yang tidak terlalu besar. Buah markisa yang dihasilkan oleh para petani ini dipasarkan dalam bentuk buah segar. Pada awalnya penghasilan para petani sangat menggembirakan, sehingga muncul keinginan petani dari daerah lainnya di Sumatera Barat untuk mengembangkan tanaman markisa dengan membuka areal tanaman yang baru. Pemasaran dalam bentuk yang sama menimbulkan kejenuhan pasar, sehingga harga menurun secara tajam dan banyak buah markisa yang tertumpuk dilokasi produksi. Mengingat kendala-kendala tersebut, agar tidak terjadi pembusukan buah di lokasi produksi, maka perlu dicari alternatif pengolahan buah markisa menjadi produk olahan seperti juice dan sirup. Juice dan sirup markisa yang beredar di pasar umumnya dibuat dari markisa siuh yang rasanya asam dengan aroma yang tajam[1]. Dilihat dari segi komposisi kimia antara jenis konyal dan siuh tidak jauh berbeda. Perbedaan hanya terdapat pada kandungan asam dan aroma, serta warna. Markisa konyal lebih manis dengan sedikit aroma, sedangkan markisa siuh mempunyai rasa asam dengan aroma tajam. Warna dari juice markisa konyal agak kurang menarik jika dibandingkan dengan warna juice markisa siuh[2]. Perbedaan warna ini besar kemungkinan disebabkan adanya enzim polifenol oksidase yang terdapat pada buah markisa konyal yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi coklat. Untuk membuktikan hipotesa ini perlu dilakukan suatu penelitian tentang keberadaan enzim polifenol oksidase serta sifat-sifatnya.

Enzim polifenol oksidase adalah suatu enzim yang termasuk pada golongan oksido reduktase yang mengkatalis proses hidrolisis

dari senyawa difenol, kemudian dilanjutkan dengan mengkatalis proses oksidasi dari senyawa difenol tersebut menjadi senyawa kuinon. Senyawa kuinon yang terbentuk sangat reaktif, sehingga akan mengalami reaksi polimerisasi menghasilkan pigmen merah, coklat atau hitam. Kesemuanya ini akan menampakan warna kecoklatan pada jaringan buah-buahan atau sayuran yang memar [3].

Proses pencoklatan dari buah atau sayuran bila kulitnya memar disebabkan karena adanya senyawa o-difenol seperti katekol, asam kafeat, dan ditambah dengan adanya enzim oksigenase. Waktu itu dipercaya bahwa produk dari reaksi yang dikatalis enzim tersebut adalah peroksida yang dapat bereaksi dengan Cu^{2+} membentuk pigmen coklat. Apel, pir, kentang dan ubi jalar diketahui mengandung senyawa fenol yang merupakan substrat dari enzim oksigenase, sedangkan pada jeruk, nenas dan pepaya tidak ditemukan senyawa fenol tersebut. Selanjutnya nama oksigenase dikenal juga dengan fenolase, dan beberapa literatur melaporkan bahwa pemberian nama untuk enzim penyebab reaksi pencoklatan pada tumbuhan adalah berdasarkan kepada jenis substrat yang digunakan untuk menentukan aktifitasnya. Namun secara umum nama polifenol oksidase lebih sering digunakan [3].

Ekstrak kasar enzim polifenol oksidase dari daun tembakau mengoksidasi katekol, asam kafeat dan asam klorogenat, akan tetapi tidak mengoksidasi senyawa monofenol. Setelah enzim ini dimurnikan hanya dapat mengoksidasi asam kafeat dan asam klorogenat saja. Enzim polifenol oksidase dari pisang, daun teh dan daun tembakau dilaporkan hanya bereaksi dengan substrat dalam bentuk o-difenol, tidak dalam bentuk mono fenol. Sedangkan enzim polifenol oksidase dari buah apel dan kentang dapat bereaksi dengan kedua jenis substrat tersebut [5].

Pada sel tumbuhan, enzim ini terdapat di dalam vakuola sel dan letaknya terpisah dengan senyawa-senyawa fenol yang terdapat di dalam tumbuhan tersebut. Inilah sebabnya reaksi pencoklatan akan terjadi hanya jika jaringan atau selnya rusak. Fungsi dari enzim polifenol oksidase ini dalam sel yang utuh belum diketahui secara pasti, diperkirakan enzim ini bisa berfungsi sebagai pemacu biosintesa lignin, atau berpartisipasi dalam perlindungan mekanik pada jaringan tumbuhan yang luka atau memar [6].

Untuk menentukan aktifitas enzim dalam ekstrak jaringan dapat dilakukan dengan mengukur kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Dalam keadaan normal kecepatan reaksi yang diukur sesuai dengan aktifitas enzim yang ada.

Aktifitas enzim polifenol oksidase diuji menggunakan pirogalol sebagai substrat dengan metoda spektrofotometri karena produk dari reaksi yang dikatalis oleh enzim merupakan senyawa yang berwarna, maka aktifitas enzim polifenol oksidase dapat dihitung dari hasil pengukuran absorban warna yang dihasilkan. Satu unit aktifitas enzim menurut IUPAC adalah jumlah enzim yang menyebabkan transformasi satu mikromol substrat permenit pada keadaan optimum sistim tersebut. Satu unit aktifitas enzim polifenol oksidase didefenisikan jumlah enzim yang menyebabkan perubahan absorban 0,001/menit pada kondisi optimumnya, berarti perubahan substrat dari satu mikromol produk mengakibatkan kenaikan absorban sebesar 0,001 [2]. Konsentrasi protein enzim dilakukan dengan metoda Lowry dan sebagai standarnya serum albumin sapi.

METODOLOGI

Pada penelitian ini metoda yang digunakan adalah pengumpulan data hasil percobaan laboratorium yang meliputi :

Persiapan sampel

Sampel markisa konyal diperoleh dari daerah produksi dengan kematangan penuh (> 75% kuning).

Ekstraksi enzim polifenol oksidase

Sampel (buah markisa) 500 g ditambahkan 200 ml buffer pospat 0.2 M, pH 7

yang mengandung 0,05 M sistein yang ditetesi 3 tetes HCl 0,01 N, kemudian dihomogenkan dengan belender 2 menit. Homogenat disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan endapan dibuang. Filtrat yang ada dipertahankan suhunya 4 ^{O}C, kemudian ditambahkan 140 ml KCl 1%, lalu distirer selama 30 menit pada suhu 4 ^{O}C. Kemudian disentrifus 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Filtart diambil dan endapan dibuang. Filtrat yang ada ditambahkan 7,5 g polietilenglikol dan ditambahkan sedikit demi sedikit aseton dengan perbandingan 1 bagian filtrat dan 2 bagian aseton,sehingga terbentuk endapan. Endapan disaring dengan kertas saring whatman No. 1, crude enzim (endapan)yang didapatkan ditimbang dan dilarutkan dalam buffer pospat pH 7 sebanyak 150 ml.

Fraksinasi enzim

Ekstrak enzim yang telah dilarutkan dengan buffer pospat seperti prosedur sebelumnya, difraksinasi dengan pengen-dapan menggunakan amonium sulfat dengan kejenuhan tertentu. Kemudian dilakukan pengadukan selama 5 jam pada suhu 4 ^{O}C, larutan disentrifus selama 1 jam, setelah itu disaringvakumkan. Residunya dilarutkan kembali dengan buffer fosfat.dan disebut fraksi ammonium sulfat.

Uji Aktifitas enzim polifenol oksidase

Aktifitas enzim polifenol oksidase diuji dengan menggunakan substrat pirogalol, buffer yang dipakai buffer pospat. Substrat pirogalol setelah diberi buffer pospat dan crude enzim dibiarkan beberapa menit pada suhu optimum. Kemudian dilihat terlihat terjadinya warna coklat. Terjadinya warna coklat menunjukan adanya aktifitas enzim polifenol oksidase.

Penentuan waktu tercapainya kestabilan warna coklat

Pirogalol 0,02 M sejumlah 3 ml dicampur dengan 4,5 ml buffer pospat pH 5,0 sebanyak 4,5 ml dan 1,5 ml enzim. Biarkan masing-masing tabung selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25 menit. Kemudian aktifitas enzim ditentikan dengan mencelupkan tabung reaksi kedalam air mendidih selama 5 menit. Biarkan dingin dan tentukan absorbannya pada panjang gelombang 330 nm. kestabilan warna tercapai setelah t menit.

Penentuan beberapa sifat enzim polifenol oksidase

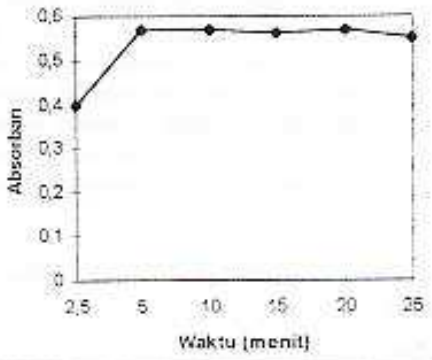
a. Kestabilan terhadap pH
   Ekstrak enzim yang telah dimurnikan dengan amonium sulfat, diinkubasi selama 30 menit pada 20 ^{O}C memakai substrat pirogalol dengan memvariasikan pH antara 2-12, kemudian aktifitas enzimnya ditentukan. Variasi pH dibuat dengan menambahkan HCl 1M atau NaOH 1 M.
b. Kestabilan terhadap panas
   Fraksi ammonium sulfat diambil 1,5 ml, kemudian diinkubasi dengan 3 ml substrat pirogalol 0,02 M, selama 5, 10, 20 menit pada suhu antara 30 - 70 ^{O}C. Kemudian aktifitas enzimnya ditentukan.

Penentuan kadar protein enzim polifenol oksidase

Kadar protein enzim ditentukan berdasarkan pada metoda Lowry dengan menggunakan larutan standar bovin serum albumin. Dari larutan induk bovin serum albumin dibuat deret larutan standar dengan variasi konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/ml. Setiap deret larutan standar diperlakukan dengan reagen Lowry (6) . Serapan diukur pada panjang gelombang 650 nm

HASIL DAN PEMBAHASAN

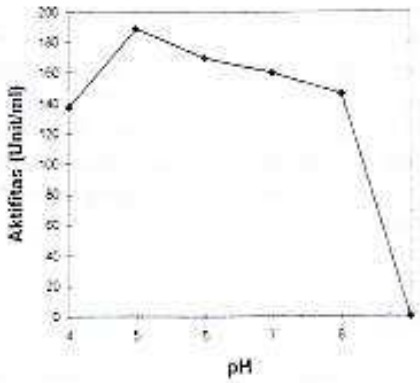
Penentuan waktu tercapainya kestabilan warna coklat dapat dilihat pada Gambar di bawah ini :



Gambar 1. Kurva waktu tercapainya kestabilan warna coklat (3 ml pirogalol 0,02 M, 4,5 ml buffer fosfat, pH 5,0 dan 1,5 ml ekstrak enzim dalam 6 buah tabung reaksi dengan variasi waktu 2,5; 5; 10; 15; 20 menit. Pengukuran pada panjang gelombang 330 nm).

Kestabilan warna coklat dicapai setelah 5 menit. Stabilnya warna ini menunjukkan telah sempurnanya kontak antara enzim PPO dengan substrat pirogalol. Selanjutnya waktu kestabilan ini digunakan untuk penentuan beberapa sifat enzim PPO yang meliputi kestabilan terhadap pH dan kestabilan terhadap suhu.

Pengaruh pH terhadap kestabilan enzim PPO ditunjukkan pada Gambar 2.

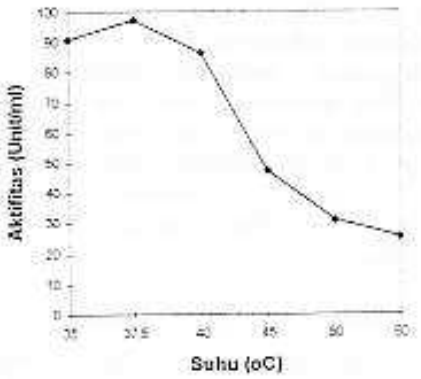


Gambar 2. Kurva pengaruh pH terhadap kestabilan enzim PPO (3 ml pirogalol 0,02 M, 4,5 ml buffer pospat pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 1,5 ml enzim diinkubasi selama 5 menit pada suhu 27^{0}C).

Dari kurva di atas terlihat bahwa pengaruh pH terhadap aktifitas enzim PPO erat kaitannya dengan kestabilan dari enzim. Pada pH < 5 aktifitas enzim PPO belum maksimum. Hal ini disebabkan karena sisi aktif enzim PPO yang terdiri dari beberapa asam amino terjadi perubahan muatan, sehingga pada pH rendah akan terprotonasi yang menyebabkan kehilangan muatan negatif. Dengan hilangnya muatan negatif kestabilan dari enzim PPO berkurang. Enzim PPO dalam keadaan kurang stabil daya katalitiknya menurun.

Masing-masing enzim mempunyai pH optimum yang tergantung pada sumber enzim dan jenis substrat yang digunakan[8]. Enzim PPO dari sari buah markisa pH optimumnya 5 dengan menggunakan substrat pirogalol.

Enzim PPO yang berasal dari sari buah markisa tidak tahan terhadap suhu yang tinggi. Hal ini dapat dilihat Gambar 3 berikut:



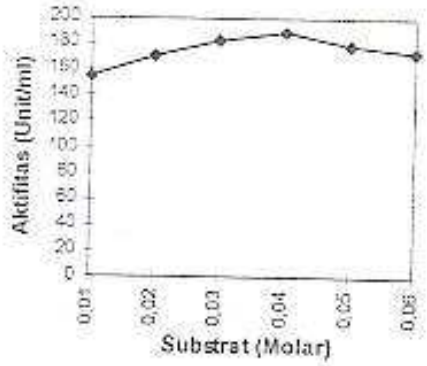
Gambar 3. Kurva pengaruh suhu terhadap aktifitas enzim PPO (3 ml pirogalol 0,02 M, 1,5 ml buffer pospat pH 5 dan 1,5 ml enzim, dengan variasi suhu 35 - 60 ^{0}C diinkubasi selama 30 menit).

Dari Gambar di atas pada awalnya dengan naiknya suhu aktifitas juga naik. Sesuai dengan kaidah reaksi kimia, kecepatan reaksi akan bertambah apabila suhu dinaikan. Kaidah ini tidak berlaku mutlak karena setelah tercapai bentuk enzim yang paling stabil. Jika suhu

dinaikkan aktifitas enzim akan menurun. Penurunan ini disebabkan oleh karena bentuk tiga dimensi dari enzim terganggu akibat dari terjadinya proses denaturasi protein oleh karena suhu yang tinggi.

Bentuk tiga dimensi dari enzim erat kaitannya dengan daya katalitik dari enzim apabila bentuk tiga dimensi enzim terganggu, maka daya katalitik enzim akan menurun atau hilang sama sekali. Setiap enzim memiliki suhu optimum dengan daya katalitik yang maksimum. Enzim PPO suhu optimumnya 37,5 ^{o}C. Untuk menginaktifkan enzim PPO cukup dengan cara memanaskan dalam air mendidih, sehingga hal ini dapat digunakan untuk pengolahan sari buah markisa.

Kinetika enzim PPO sari buah markisa menggunakan substrat pirogalol dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini :



Gambar 4. Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktifitas enzim PPO (3 ml pirogalol dengan konsentrasi 0,01 - 0,06 M, 4,5 ml buffer pospat pH 5 dan 1,5 ml enzim PPO, diinkubasi selama 30 menit).

Penambahan konsentrasi substrat berarti memperbanyak jumlah molekul substrat yang dapat dirubah menjadi produk. Aktifitas enzim bertambah bila produk terbentuk bertambah demikian juga sebaliknya bila jumlah substrat berkurang aktifitas enzim akan berkurang. Pada penelitian ini konsentrasi substrat optimum 0,04 M. Pada saat semua enzim telah bergabung dengan substrat sehingga kenaikan konsentrasi substrat tidak menaikkan kecepatan reaksi pembentukkan kompleks antara enzim dan substrat. Dengan kata lain interaksi substrat dan enzim optimum, sehingga aktifitas akan tetap. Jika konsentrasi substrat masih ditingkatkan, maka akan terjadi penurunan aktifitas enzim PPO. Hal ini disebabkan karena molekul substrat berinteraksi dengan kompleks produk substrat. Sehingga produk yang dihasilkan menurun dan aktifitas yang didapatkan juga menurun.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh, ternyata dalam sari buah markisa terdapat enzim PPO, Memiliki aktifitas dengan substrat pirogalol pada pH 5 dan suhu 37,5 ^{o}C dengan lama waktu inkubasi 30 menit. Jumlah substrat pirogalol yang dibutuhkan sebanyak 3 ml dan ekstrak enzim 1,5 ml.

DAFTAR PUSTAKA

1. Basoeki, 1993. Membuat sirup buah markisa dalam kumpulan kliping markisa. Pusat Informasi Pertanian Trubus, halaman 52-54.
2. Lourenco, E.J., et all., 1992. Polyphenol oksidase from sweet potato purification and properties. J. Agr. Food Chem., 40, 2369-2373.
3. Zhou, P., et all., 1993. Potensial purification and some properties of monroe apple polyphenol oksidase. J. Agr. Food Chem. 41, 532-536.
4. Buchelli, C.S., 1994. Contribution of enzymic browning to color in sugar cance juice. J. Agr. Food Chem. 42, 257-261.
5. Chaidir, z (1996). Propil sari buah markisa (Passiflora sp) hasil petani Alahan Panjang Sumatera Barat. Hasil penelitian yang belum dipublikasikan.

6. Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193, 265-275, 1951.
7. Mayer, A.M. Polyphenoloxidase of kiwifruit. J. Food Sci. 50, 679-684, 1985.
8. Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Che. Soc., 56, 685-693, 1934.