

PENENTUAN AKTIVITAS DAN INHIBISI ENZIM POLIFENOL OKSIDASE DARI APEL. (*PYRUS MALUS* (L))

Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Polifenol oksidase (E.C.1.14.18.1; PPO) adalah enzim utama yang mengkatalisis oksidasi senyawa fenol menjadi quinon dan kemudian dipolimerisasi menjadi pigmen melaniadin yang berwarna coklat. Enzim polifenol oksidase dari apel diekstrak dengan aseton dingin. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan substrat katekol, pirogalol dan tirosin. Inhibitor yang digunakan untuk menghambat aktivitas enzim adalah asam amino sistein, glisin dan asam askorbat. Aktivitas enzim polifenol oksidase dari apel paling tinggi terhadap substrat pirogalol yaitu 103,64 unit, kemudian terhadap katekol 58,09 unit dan terhadap tirosin paling rendah yaitu 10,33 unit. Sistein dengan konsentrasi 10 mM mempunyai daya inhibisi 83,5 %, glisin konsentrasi 100 mM mempunyai daya inhibisi 51,6 % dan asam askorbat 10 mM mempunyai daya inhibisi 63,0 %.

ABSTRACT

Polyphenol oxydase is the main enzyme catalyzing oxidation of phenol into quinone and further dipolymerized into a brown color of melaniadine pigment. Polyphenol oxydase enzyme from apple was extracted with a cold acetone. The activity of the enzyme was determined by the use of catecol, pyrogallol and tyrosine substrates. The inhibitor used to block the enzyme activity were cysteine, glycine and ascorbic acid. The activity of polyphenol oxydase from apple was highest toward pyrogallol substrate, i.e. 103.64 unit. Cysteine at a concentration of 10 mM had an inhibition ability of 83.5 %, glycine at a concentration of 100 mM had that of 51.6 % and 10 mM ascorbic acid had that of 63.0 %.

PENDAHULUAN

Enzim polifenol oksidase adalah enzim yang bekerja pada reaksi pencoklatan (browning) buah-buahan. Pencoklatan enzimatik dalam proses pengolahan merupakan masalah yang serius, karena bagian yang terkelupas, dipotong akan menjadi gelap warnanya ketika kena udara. Hal ini tidak diinginkan karena

menampilkan rupa serta warna yang tidak bagus dan diiringi dengan rasa yang tidak enak. Proses pencoklatan yang terjadi akan mengurangi kualitas produk dan menurunkan minat konsumen (Perl I.M dan Friedman, 1990).

Buah apel selain dikonsumsi dalam keadaan segar, juga diolah menjadi minuman atau sari buah. Pada pengolahan apel menjadi minuman, dengan adanya enzim polifenol oksidase dalam buah apel sangat merugikan karena dapat menimbulkan warna coklat yang tidak diinginkan. Dalam buah apel terdapat beberapa macam senyawa fenol yang dapat menjadi substrat enzim polifenol oksidase, diantaranya katekol, pirogalol dan tirosin. Supaya diperoleh sari buah apel yang baik, maka dilakukan usaha mencegah reaksi pencoklatan dengan menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase dengan menggunakan inhibitor. Dalam pemilihan inhibitor yang digunakan harus diperhatikan hal-hal yang akan mempengaruhi produk sari buah tersebut seperti warna, rasa dan bau. Hal yang sangat penting sekali yaitu menyangkut segi keamanan, dimana inhibitor yang digunakan tidaklah bersifat racun. Untuk menghambat menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase pada penelitian ini digunakan golongan asam amino seperti sistein, glisin dan golongan asam yaitu asam oksalat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas maksimum enzim polifenol oksidase terhadap substrat katekol, pirogalol dan tirosin serta menentukan daya inhibisi sistein, glisin dan asam oksalat dalam menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase pada buah apel.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Apel malang varietas manalagi, buffer posfat pH 7, KCl 1%, aseton, katekol, pirogalol, tirosin, asam askorbat, sistein dan glisin.

Metoda Penelitian

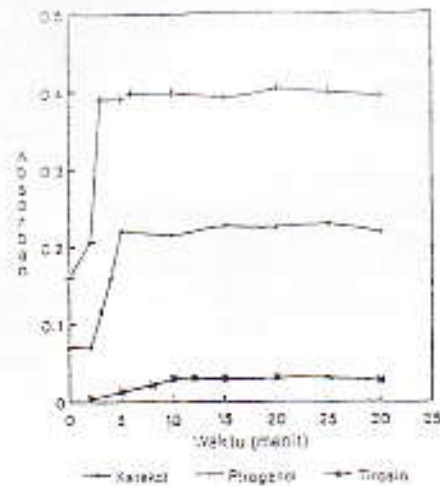
300 gr apel ditambahkan 600 ml buffer posfat (KH_2PO_4 + K_2HPO_4) 0,02 M pH 7 yang mengandung 0,005 M sistein. Campuran diblender, ampasnya dibuang. Supernatan ditambah KCl 1% sebanyak 210 ml. Endapan yang terbentuk dipisahkan lagi. Supernatannya ditambah aseton dingin dengan perbandingan 1 bagian supernatan dan dua bagian aseton dingin. Diamkan larutan dalam kulkas, kemudian saring dan ditimbang. Endapan protein enzim yang terbentuk dilarutkan dalam 100 ml buffer posfat pH 7. Larutan ini merupakan hasil ekstrak kasar enzim polifenol oksidase. Terhadap ekstrak kasar ditentukan aktivitas enzim dengan menggunakan substrat katekol, pirogalol dan tirosin. Aktivitas enzim ditentukan pada kondisi pH, suhu dan konsentrasi substrat yang optimum. Masing-masing substrat katekol, pirogalol dan tirosin diambil sebanyak 3 ml, kemudian ditambah 4,5 ml buffer sitrat dan 1 ml ekstrak enzim. Biarkan larutan sampai warna coklat yang terbentuk stabil, absorban larutan diukur pada panjang gelombang maksimumnya.

Untuk menentukan daya inhibisi, kedalam campuran 3 ml substrat pirogalol dan 4,5 ml buffer sitrat diisikan masing-masing 1 ml inhibitor sistein, asam askorbat dan glisin dengan konsentrasi yang bervariasi 2 s/d 10 mM

untuk sistein dan asam askorbat, 10 s/d 100 mM untuk glisin. Tambahkan 1 ml enzim pada masing-masing tabung dan kocok. Biarkan campuran sampai tercapainya kestabilan warna, absorban larutan diukur pada panjang gelombang maksimumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan menggunakan substrat katekol, pirogalol dan tirosin, waktu tercapainya kestabilan warna coklat yang terbentuk berbeda. Perbedaan ini dapat dilihat pada Gambar 1.



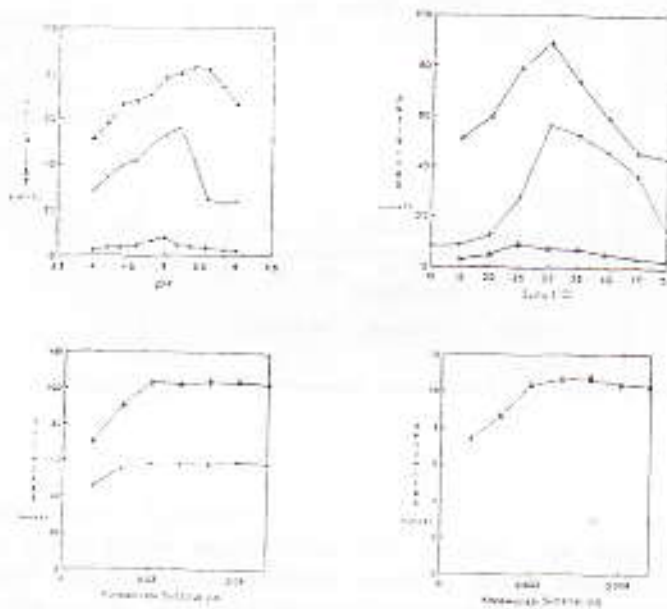
Gambar 1. Waktu tercapainya kestabilan warna coklat yang dihasilkan.

Pada Gambar 1 terlihat untuk substrat katekol memberikan warna yang stabil setelah 5 menit, untuk substrat pirogalol memberikan warna yang stabil setelah 3 menit dan untuk substrat tirosin setelah waktu 10 menit. Enzim polifenol oksidase pada apel Malang cepat memberikan warna coklat pada substrat pirogalol, berarti enzim polifenol oksidase ini lebih cepat bekerja mengoksidasi substrat pirogalol daripada substrat yang lain karena substrat pirogalol mempunyai gugus hidroksi yang lebih banyak.

Substrat yang digunakan berpengaruh terhadap pH optimum aktivitas enzim. Dengan substrat yang berbeda akan didapatkan pH optimum yang berbeda pula, dapat dilihat pada Gambar 2. Enzim polifenol oksidase pada penelitian ini mempunyai pH optimum 5,2 untuk substrat katekol, 5,4 untuk substrat pirogalol dan 5,0 untuk substrat tirosin. Perbedaan ini disebabkan karena pH optimum selain ditentukan oleh keadaan ion enzim juga dipengaruhi oleh keadaan ion dari substrat. Hanya pada nilai pH optimum, enzim dan substrat terdapat dalam keadaan ion yang sesuai dan pada keadaan pH optimum konsentrasi maksimum dari enzim dan substrat benar-benar bermuatan (Martin D.W., Mayes P.A., Roduall V.W., 1983).

Suhu optimum dan konsentrasi substrat optimum enzim polifenol oksidase pada apel Malang juga dapat dilihat pada Gambar 2. Dengan menggunakan substrat katekol dan pirogalol didapatkan suhu optimum enzim polifenol oksidase 30 °C, sedangkan dengan substrat tirosin didapatkan suhu optimum 25 °C. Dengan menggunakan substrat yang berbeda diperoleh suhu optimum yang berbeda pula, karena suhu optimum enzim dipengaruhi oleh ketahanan enzim dan substrat terhadap panas. Pada suhu tinggi substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi, sehingga sisi reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki lokasi aktif enzim (Maggy T.S, 1980).

Pada Gambar 2 dapat dilihat konsentrasi substrat optimum untuk katekol dan pirogalol adalah 0,03 M dan untuk tirosin mempunyai konsentrasi substrat optimum yang lebih kecil yaitu 0,003 M. Dengan menggunakan substrat katekol dan pirogalol didapatkan konsentrasi substrat optimum yang sama. Sedangkan untuk tirosin yang terpakai oleh reaksi enzim kecil. Hal ini disebabkan karena enzim polifenol oksidase pada apel ini mempunyai kemampuan yang rendah untuk mengoksidasi tirosin (Zhen P. Smith N.L & Lee C.Y, 1993).



Gambar 2. Kondisi optimum enzim polifenol oksidase dari buah apel

Aktivitas maksimum enzim polifenol oksidase dengan menggunakan substrat katekol adalah 58,9 unit, dengan pirogalol 103,64 unit dan dengan tirosin 10,33 unit. Aktivitas ini ditentukan pada kondisi pH, suhu dan konsentrasi substrat optimum yang diperoleh.

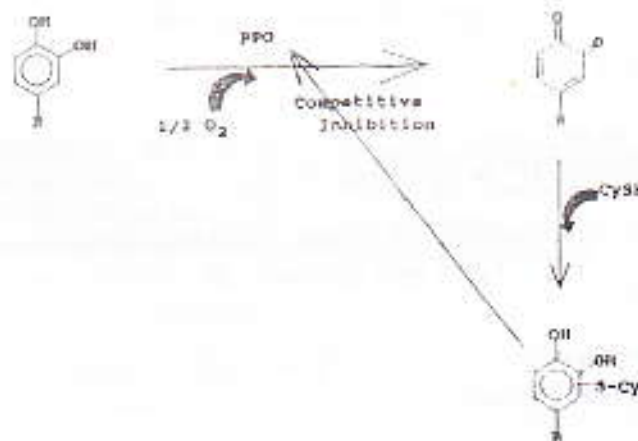
Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim polifenol oksidase dengan menggunakan substrat pirogalol dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh inhibitor sistein, glisin dan asam askorbat terhadap aktivitas enzim polifenol oksidase.

Konsentrasi (mM)	Sistein		Glisin		Asam askorbat	
	A	I	A	I	A	I
0	103,64	-	103,64	-	103,64	-
2	58,67	43,2			72,44	30,1
4	35,76	65,5			60,42	41,7
6	22,70	78,1			51,30	50,5
8	20,51	80,2			44,36	57,2
10	17,14	83,5	60,94	41,2	38,15	63,0
20			56,28	45,7		
40			55,45	46,5		
60			53,65	48,2		
80			52,23	49,6		
100			50,47	51,3		

A = Aktivitas (unit) I = % Inhibisi

Pada konsentrasi 10 mM sistein mampu menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase dengan daya inhibisi 83,5 %, asam askorbat pada konsentrasi yang sama mempunyai daya inhibisi 63,0 %. Glisin mempunyai kemampuan yang paling rendah sebagai inhibitor, pada konsentrasi 100 mM mempunyai daya inhibisi hanya 51,6 %. Sistein mempunyai daya inhibisi paling tinggi karena sistein merupakan asam amino yang mempunyai gugus sulfhidril. Gugus sulfhidril dari sistein dapat bereaksi dengan produk O₂ quinon membentuk suatu senyawa produk tambahan (CQAC = Cysteine Quinon Addition Compound), akibatnya melanoidin yang berwarna coklat tidak terbentuk. CQAC mempunyai struktur yang mirip dengan substrat sehingga CQAC juga dapat berikatan dengan pusat aktif enzim berkompetisi dengan substrat. Dengan demikian CQAC memberikan inhibitor yang bersifat kompetitif seperti terlihat pada Gambar 3 (Richard and Goupy, 1993).



Gambar 3. Inhibisi sistein dan CQAC terhadap reaksi enzim polifenol oksidase.

Glisin merupakan asam amino yang tidak mempunyai gugus sulfhidril, hanya mampu menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase melalui pembentukan kompleks stabil dengan Cu yang merupakan kofaktor enzim, sehingga enzim menjadi tidak efektif. Sistein menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase melalui dua cara yaitu melakukan aksi terhadap produk reaksi dan melakukan aksi terhadap enzim, sedangkan glisin menghambat hanya dengan melakukan aksi terhadap enzim. Oleh karena itu glisin mempunyai daya inhibisi yang rendah (Lowrenco 1992, Richard and Goupy 1993).

Asam askorbat mempunyai daya inhibisi 63,0 %. Kerja asam askorbat sebagai inhibitor berbeda dengan asam amino sistein dan glisin. Asam askorbat mereduksi kembali quinon yang terbentuk menjadi senyawa fenol dimana asam askorbat melepaskan 2 molekul hidrogennya dengan membentuk dihidro asam askorbat. Dengan terbentuknya senyawa fenol kembali maka reaksi lanjutan pembentukan melanin dari quinon tidak berlangsung (Yanovitz Klapp, Richard F.C 1990).

KESIMPULAN

Enzim polifenol oksidase dari buah apel mempunyai aktivitas maksimum 58,09 unit terhadap substrat katekol, 103,64 unit terhadap substrat pirogalol dan 10,33 unit terhadap substrat tirosin. Sistein mempunyai daya inhibisi paling tinggi dari pada glisin dan asam askorbat, pada konsentrasi 10 mM dapat menghambat aktivitas sebesar 83,5%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Janovitz Klapp A.H., Richard F.C. (1990), "Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase", *J. Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
2. Lowrenco E.J. (1992), "Polyphenol Oxidase from Sweet Potato Purification and Properties", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2369-2373.
3. Maggy T.S. (1980), "Pengantar Biokimia", PAU IPB, 93-99.
4. Martin D.W., Mayes P.A and Rodwell V.W. (1983), "Review of Biochemistry", 19th ed, California, 87-90.
5. Perl I.M. and Friedman M. (1990), "Inhibition of Browning by Sulfur Amino Acids.3. Apple and Patatoes". *J. Agric. Food Chem.* 38, 1652-1656.
6. Richard Forgel F.C. and Goupy P.M. (1993). "Cystein as Inhibition of Enzymatic Browning.2. Kinetic Studies". *J. Agric. Food Chem.* 41, 532-536.
7. Zhou P., Smith N.L. and Lee C.Y. (1993). "Potential Purification and Some Properties of Mouroe Apple Peel Polyphenol Oxidase". *J. Agric. Food Chem.* 41, 532-536.