

MEMPELAJARI SIFAT INHIBISI NATRIUM BISULFIT DAN ASAM SITRAT TERHADAP KECEPATAN REAKSI PENCOKLATAN ENZIMATIK POLIFENOL OKSIDASE KENTANG (*SOLANUM TUBEROSUM*)

Masdiaty

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Inhibisi natrium bisulfit dan asam sitrat terhadap kecepatan reaksi pencoklatan enzimatis polifenol oksidase dipelajari dengan memakai katekol sebagai substrat melalui metoda spektrofotometri pada 470 nm. Polifenol oksidase (*E.C.1.14.18.1*) diekstraksi dari kentang (*Solanum tuberosum*) dan setelah didialisis diperoleh aktifitas spesifiknya 104,418 Unit/mg. Kondisi optimum reaksi pencoklatan adalah pada suhu 32 °C, pH 7 dan konsentrasi substrat 10 mM. Pada kondisi ini tingkat inhibisi natrium bisulfit lebih efektif dari asam sitrat dengan harga I_{50} 15 mM, sedangkan asam sitrat I_{50} tidak tercapai. Percobaan juga menunjukkan natrium bisulfit mempunyai tipe inhibisi kompetitif dengan harga K_i 10,63 mM sedang asam sitrat non kompetitif dengan harga K_i 23,82 mM.

ABSTRACT

The citric acid and sodium bisulphite inhibition to browning reaction of enzymatic polyphenol oxidase was studied with spectrophotometry method at 470 nm, using catechol as substrate. Polyphenol oxidase was extracted from potatoe (*Solanum tuberosum*) and dialyzed to find its specific activity at 104,418 Unit/mg. The optimum condition in the browning reaction was found at temperature 32°C, pH 7 and concentration of substrate 10 mM. The level of sodium bisulphite degree inhibition was apparently more effective than that of citric acid at the value of I_{50} 15 mM but in other one citric acid uncountable. These results revealed that the type of inhibition of natrium bisulphite seemed to be categorized as competitive had K_i value 10,63 Mm but in other one, non competitive had K_i 23,82 mM.

PENDAHULUAN

Inhibisi reaksi pencoklatan enzimatis yang terjadi pada buah/sayuran merupakan tantangan yang menarik pada penelitian dilaboratorium industri yang memproses bahan makanan.

Dalam beberapa hal pencoklatan enzimatik tidak dikehendaki terjadinya, umpamanya seperti pada apel, ubi jalar, ketela pohon, kentang dan sebagainya sehingga perlu penanganan serius untuk mengatasinya. Berbagai penelitian dilakukan untuk mempelajari antar aksi penyebab terjadinya reaksi pencoklatan ini dan pencegahannya dengan menambahkan zat-zat aditif yang anti toksik sebagai inhibitor sehingga tetap terjaga keamanannya untuk konsumen (Kermasha, 1993). Richard (1992) melakukan inhibisi terhadap reaksi pencoklatan pada buah apel dengan memakai sistein sebagai inhibitor sedangkan Kermasha (1992) mempergunakan asam aromatik dari turunan benzoat, sinamat dan phenil alkanoat sebagai inhibitor untuk memperlambat terjadinya proses pencoklatan dijamur. Pada dasarnya reaksi ini dipelajari dari terjadinya proses reaksi Polifenol oksidase (E.C.1.10.1.1) dengan substratnya senyawa mono atau difenol yang terdapat bersama-sama didalam buah atau sayuran tersebut dimana dengan adanya udara akan terhidrolisis menjadi substituent polimer yang berwarna coklat.

Penelitian ini mencoba mempelajari tipe dan tingkat inhibisi natrium bisulfit dan asam sitrat sebagai inhibitor terhadap reaksi pencoklatan enzimatik polifenol oksidase hasil ekstraksi dari kentang (*Solanum tuberosum*) varietas Cipanas dengan substrat katekol. Pada dasarnya natrium bisulfit telah dikurangi pemakaiannya pada bahan makanan karena membahayakan kesehatan, namun keefektifannya sebagai zat anti pencoklatan dapat dipakai sebagai pembanding terhadap inhibitor lain (Twigg, 1974). Bagaimana antar aksi sebenarnya dari kedua inhibitor tersebut dipelajari berdasarkan kinetika reaksi enzimatik yang berlangsung dalam proses reaksi pencoklatan ini.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah Spektrofotometer Spectronic 21 D, thermostat, pH meter, centrifuge, blender, magnetik stirer, shaker, rotary evaporator, oven, kantong dialisa dan alat-alat gelas lainnya. Bahan yang dipakai adalah kentang segar varietas Cipanas, aseton, etanol 95%, bufer fosfat, buffer tris-HCl, kalium klorida, sistein, katekol, natrium bisulfit, dan asam sitrat.

Metoda

1. Ekstraksi enzim

Polifenol oksidase diekstrak dari 100 g kentang segar yang diiris dan diblender pada suasana dingin dalam campuran bufer fosfat 0,1 M pH 6,5 dan sistein 0,01 M. Homogenat disaring, kemudian supernatan ditambah KCl 1% diaduk dengan magnetik stirer selama 10 menit, dan disentrifus pada kondisi dingin dengan kecepatan 8000 rpm sehingga didapatkan ekstrak enzim kasar yang berwarna putih. Filtrat difraksinasi dengan aseton dingin sebanyak 1,6 kali volumenya, diendapkan semalam dalam suasana dingin dan kemudian endapan dilarutkan dalam 60 ml buffer tris HCl 0,05 M pH 7,8 melalui pengadukan

dengan magnetik stirer. Larutan homogen ini didialisis pada suhu 2 - 4°C dengan memasukkan semua larutan enzim ke dalam kantong dialisa yang ujungnya diikat dengan tali dan digantungkan ke dalam gelas piala yang berisi buffer tris HCl 0,05 M pH 7,8 sebanyak 1000 ml. Gelas piala diletakkan dalam wadah es, diaduk dengan magnetik stirer dan lakukan proses dialisis selama 24 jam. Selama dialisis buffer diganti sebanyak 5 kali. Setelah proses dialisis selesai, larutan enzim dikeluarkan dari kantong dan partikel kasar yang masih berada di dalam larutan dipisahkan dengan sentrifus sehingga diperoleh larutan yang berwarna jernih. Volume larutan ini diukur dan digunakan untuk ditentukan aktivitasnya.

2. Penentuan aktivitas enzim polifenol oksidase.

Aktivitas polifenol oksidase ditentukan dari laju reaksi oksidasi substrat katekol oleh polifenol oksidase hasil ekstraksi melalui metoda dialisis menjadi produk berwarna coklat yang dimonitor dengan memakai metoda Spektrofotometri pada panjang gelombang 470 nm. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan laju reaksi awal yang ditentukan dari kemiringan garis linear perubahan absorbansi produk terhadap waktu. Satu unit enzim didefinisikan sebagai kenaikan absorbansi 0,001 permenit yang dimodifikasi terhadap panjang gelombang serapan maksimum 470 nm dan suhu 32 °C (Shengxue Ma, 1992).

3. Penentuan kondisi optimum dari aktivitas polifenol oksidase.

Kondisi optimum dari aktivitas polifenol oksidase dideteksi pada suhu 28 - 36 °C, pH 6 - 8 dan konsentrasi substrat 1 - 50 mM, yang diamati dengan bertambah tingginya aktivitas enzim pada setiap perlakuan variasi yang dilaksanakan secara bertahap. Pada kondisi optimum ini, aktivitas polifenol oksidase yang diperoleh diasumsikan identik dengan laju maksimum reaksi pencoklatan (V_{max}).

4. Penentuan tingkat dan tipe inhibisi inhibitor.

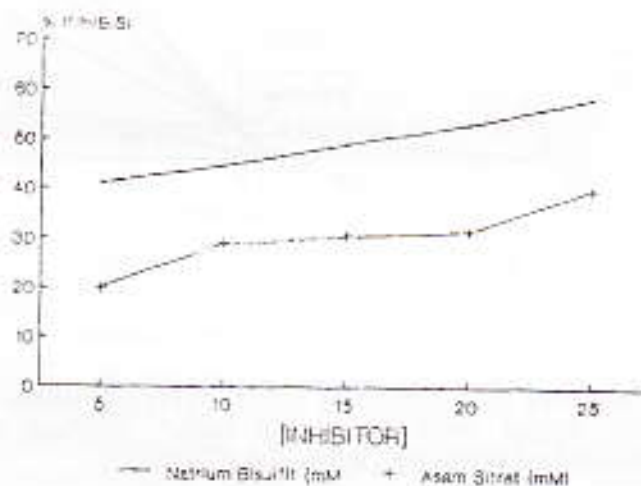
Tingkat dan tipe inhibisi dari inhibitor ditentukan dengan cara menambahkan masing-masing inhibitor setiap perlakuan ke dalam reaksi enzimatik pada kondisi optimum terjadinya reaksi pencoklatan. Pengujian dilakukan terhadap % inhibisi, harga V_{max} sebelum dan saat inhibisi, K_m (konstanta Michaelis-Menten tanpa inhibitor), K_a (konstanta Michaelis-Menten dengan penambahan inhibitor) dan K_i (Konstanta inhibisi). Persentase inhibisi ditentukan pada konsentrasi substrat katekol optimum dan konsentrasi inhibitor bervariasi dari 10 - 50 mM, V_{max} saat inhibisi ditentukan setiap penambahan konsentrasi inhibitor 5 - 25 mM pada konsentrasi substrat katekol 1 - 10 mM. K_a ditentukan dengan memakai kurva Lineweaver-Burk dan kemudian diprogram dengan metoda regresi linear (Walpole, 1982), sedangkan K_i ditentukan melalui kurva kemiringan garis regresi linear Lineweaver-Burk terhadap konsentrasi inhibitor (Robert, 1977).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polifenol oksidase yang diekstrak dari kentang varietas Cipanas diendapkan dengan aseton, kemudian setelah proses dialisis diperoleh aktivitas spesifiknya 104,418 Unit/mg.

Autaraksi reaksi pencoklatan enzimatis diteliti pada kondisi optimum aktivitas polifenol oksidase karena pada kondisi ini reaksi pencoklatan enzimatis berlangsung secara sempurna. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas polifenol oksidase berada pada puncak optimum pada suhu reaksi 32°C, pH 7 dan konsentrasi substrat (katekol) 10 mM. Menurut Eskin (1971) pH optimal polifenol oksidase ini adalah sekitar 6.0 - 7.0 dan pada suhu 40°C polifenol oksidase terdenaturasi.

Pengaruh inhibitor natrium bisulfit dan asam sitrat diamati dari uji aktivitas polifenol oksidase setelah dan sebelum ditambahkan inhibitor memperlihatkan daya inhibisi yang berbeda.



Gambar 1. Kurva % inhibisi terhadap konsentrasi inhibitor pada konsentrasi katekol 10 mM.

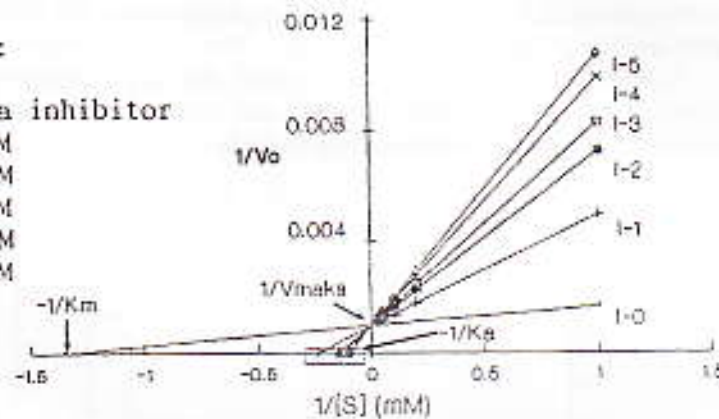
Pada Gambar 1 terlihat bahwa sifat inhibisi natrium bisulfit lebih tinggi dari asam sitrat dimana harga I_{50} (konsentrasi inhibitor saat inhibisi mencapai 50%) untuk natrium bisulfit diperoleh pada konsentrasi 15 mM dan nilai ini tidak didapat pada asam sitrat meskipun konsentrasi asam sitrat dinaikkan sampai 25 mM.

Untuk mengetahui tipe inhibisi dari kedua inhibitor ini, maka melalui kurva transformasi linear Lineweaver-Burk pada variasi konsentrasi katekol 0 - 30 mM dan konsentrasi masing-masing inhibitor 0 - 25 mM maka untuk natrium bisulfit diperoleh bahwa tipe inhibisinya adalah kompetitif (koefisien determinasi 99,20 %) seperti yang diperlihatkan oleh Gambar 2 dibawah ini. Menurut Eskin (1971) natrium bisulfit menghambat reaksi pencoklatan dengan

cara memakai oksigen yang tersedia sehingga jumlah substrat yang dioksidasi oleh polifenol oksidase berkurang. Pada kurva terlihat harga K_m bertambah besar dengan adanya inhibitor tanpa menurunkan aktivitas enzim sendiri, konsekwensinya pembentukan melanin menjadi berkurang. Mekanisme lain dinyatakan oleh R.J.Embs dan P. Markakis (1965), menurutnya sulfit mencegah reaksi pencoklatan melalui penggabungan dengan produk enzimatik perantara (kuinon) membentuk senyawa-senyawa adisi sulfit-kuinon yang tidak berwarna.

Keterangan:

- I-0 = tanpa inhibitor
- I-1 = 5 mM
- I-2 = 10 mM
- I-3 = 15 mM
- I-4 = 20 mM
- I-5 = 25 mM

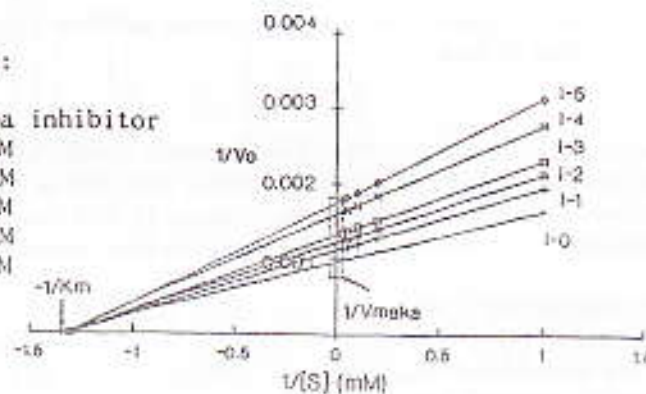


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi natrium bisulfit 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20mM, 25 mM dan tanpa inhibitor terhadap hubungan laju reaksi pencoklatan dengan konsentrasi substrat katekol.

Tipe inhibisi dari asam sitrat ditentukan melalui kurva Lineweaver-Burk yang disempurnakan dengan persamaan regresi linear (koefisien determinasi 96,75 %), memperlihatkan tipe non kompetitif (Gambar 3).

Keterangan:

- I-0 = tanpa inhibitor
- I-1 = 5 mM
- I-2 = 10 mM
- I-3 = 15 mM
- I-4 = 20 mM
- I-5 = 25 mM



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi asam sitrat (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM dan tanpa inhibitor terhadap hubungan antara laju reaksi pencoklatan dengan konsentrasi substrat katekol.

Tabel 1. Nilai K_m , dan V_{max} , dari oksidasi katekol oleh ekstrak enzim PPO kentang akibat penambahan dan tanpa inhibitor pada suhu 32 °C, pH 7,0 selama 1 menit.

Inhibitor	K_m (μ M)	V_{max}	K_i (mM)
Tanpa inhibitor	0,74	1055	
Natrium Bisulfit			
5 μ M	4,24	1055	10,63
10 μ M	6,64	1055	
15 μ M	7,72	1055	
20 μ M	9,42	1055	
25 μ M	10,33	1055	
Asam sitrat			
5 mM	0,77	901	23,82
10 mM	0,76	825	
15 mM	0,77	760	
20 mM	0,75	628	
25 mM	0,81	575	

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa nilai K_i dari natrium bisulfit lebih kecil dari asam sitrat. Hal ini menunjukkan bahwa natrium bisulfit lebih efektif sebagai inhibitor untuk menghambat reaksi pencoklatan dari asam sitrat karena kompleks antara enzim dengan inhibitornya lebih stabil.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan, inhibisi natrium bisulfit dan asam sitrat terhadap reaksi pencoklatan oleh polifenol oksidase ditentukan pada kondisi optimum aktivitas polifenol oksidase memproses reaksi tersebut yaitu pada suhu 32°C, pH 7 dan konsentrasi substrat 10 mM. Tingkat inhibisi natrium bisulfit lebih tinggi dari asam sitrat dimana harga I_{50} nya dapat diperoleh pada konsentrasi 15 mM. Sebaliknya pada konsentrasi yang sama nilai ini tidak diperoleh pada asam sitrat. Natrium bisulfit merupakan inhibitor yang mempunyai tipe inhibisi kompetitif dengan harga K_i 10,63 mM sedangkan asam sitrat tipe inhibisinya adalah non kompetitif dengan harga K_i 23,82 mM

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemasha, S., Mireille Goetghebeur dan Aland Mon Fette, 1993. Studies on Inhibition of Mushroom Polyphenol Oxidase Using Chlorogenic Acid as Substrate. *J. Agric. Food Chem.* 41:526-531.
2. Richard-Forget, F.C., P.M Goupy, J.J. Nicolas, 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatik. 2. Kinetic studies, *J. Agric. Food Chem.* 40 : 2108-2112.
3. Twigg, B.A., L.E. Scott, J.C. Bouwkamp, 1974. Color of process sweet potatoes; effect of additives, *J. Food Sci.* 39 :565-567.
4. Shengxua.Ma., J.L. Silva, J.O. Hearnberger, J.O. Garner, 1992. Prevention of enzymatik darkening in frozen sweet potatoes (Ipomoeabatatas (F) Lam) by water blanching: Relationshipamong darkning, phenols, and polyphenol oxidase activity, *J. Agric. Food Chem.* 40:864-867.
5. Walpole, R.E., 1982, *Introduction to statistics*, 3th ed. Collier Macmillan, London, pp. 353-379.
6. Roberts, D.V., *Enzyme kinetics*, 1997, Cambrige University Press, London, pp. 48-73.
7. Eskin, N.A.M., H.M. Henderson dan R.J. Towaend., 1971, *Biochemistry of foods*, Academic press, New York, San Fransisco, London.
8. Embe, R.J. dan P. Markakis, 1965. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase, *J. Food Sci.*, 30, 753.