

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI POLIFENOL OKSIDASE KENTANG

Masdiaty

Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Andalas

ABSTRAK

Polifenol Oksidase (PPO) (EC 1.14.18.1) yang diekstrak dari kentang (*Solanum Tuberosum*) menghasilkan kelipatan kemurnian 2,6 kali setelah diendapkan dengan aseton dan perlakuan dialisis dengan buffer Tris 0.05 M pH 7.8. Enzim hasil pemurnian parsial ini mempunyai nilai Km 4.02, pH optimal 6.5 dan temperatur optimal 25°C untuk substrat asam klorogenat. Sementara itu untuk catekol nilai-nilai tersebut diatas berturut-turut adalah 1.85, 7.0 dan 30°C.

ABSTRACT

Polyphenol Oxydase (PPO) (EC 1.14.18.1) extracted from potato (*Solanum Tuberosum*) was purified 2.6 fold by precipitation with acetone and by dialysis with 0.05 M Tris buffer pH 7.8. This partially purified enzyme has a Km values 4.02, optimal pH 6.5, and optimal temperature 25°C for chlorogenic acid. While for catechol, the values are 1.85 ; 7.0 and 30°C respectively.

PENDAHULUAN

Polifenol Oksidase (PPO) (EC 1.14.18.1) adalah enzim kelompok oksidoreduktas... yang mengkatalisis reaksi hidroksilasi monofenol dan oksidasi o-difenol menjadi kuinon (Lourenco, 1992). Senyawa kimia ini sangat reaktif, dengan cepat akan berpolimerisasi membentuk pigmen coklat atau melanin. Fenomena pencoklatan ini merupakan masalah besar dalam teknologi pengolahan bahan makanan. Walaupun tidak berbahaya terhadap konsumen namun reaksi pencoklatan tersebut menyebabkan menyimpangnya cita rasa, warna, bau dan menurunnya nilai gizi serta nilai ekonomis (Paulson, 1980; Kermasha, 1993).

Beberapa bahan pangan buah-buahan dan sayur-sayuran sangat rentan terhadap reaksi pencoklatan bila bahan tersebut mengalami kerusakan mekanis atau dalam proses pengolahan. Oleh sebab itu pengaruh PPO ini telah dipelajari secara intensif

dari berbagai jenis jaringan bahan pangan. Telah dilaporkan bahwa sifat PPO berbeda antara satu jaringan tanaman dengan yang lainnya. Reaksi oksidasi dikatalisis oleh hampir semua enzim PPO misalnya jamur, kentang, pisang dan mangga. Sebaliknya reaksi hidroksilasi baru ditemui pada kentang dan jamur. Disamping itu pH optimum dari kerja PPO juga bervariasi, tergantung jenis substrat (Lourenco, 1992). Dilaporkan juga bahwa harga Km PPO berbagai substrat pisang berbeda masing-masingnya, demikian pula untuk anggur (Galeazzi dan Sqarbierrri, 1981; Sanchez, 1988).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh lebih banyak informasi tentang PPO yang diisolasi dari kentang yakni yang sehubungan dengan pemurnian dan karakterisasi PPO sumber tersebut.

METODOLOGI

Bahan yang digunakan ialah Aseton teknis yang didestilasi terlebih dahulu; NaH_2PO_4 , H_2O , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ diperoleh dari Merck dengan kualitas P.A.; standar katekol diperoleh dari BDH Chem. LTD; Asam klorogenat diperoleh dari Sigma Chem. Co; Bovin Serum Albumin, Reagen Lowry; Reagen Folin Ciocalteu; CuSO_4 ; kentang diperoleh dari Pasar Raya Padang.

Ekstraksi dan Pemurnian PPO

Kentang dikupas, ditimbang 20 gram, diiris, kemudian dimasukkan kedalam blender yang telah berisi 60 mL buffer fosfat 0,1 M, pH 7, dan 6 mL PEG 20%. Homogenisasi dilakukan selama 3 menit pada lemari es. Homogenat disaring dan filtrat ditampung. Filtrat langsung disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 60 menit. Endapan dibuang, supernatan dikumpulkan dan diukur volumenya. Selanjutnya diukur aktivitas PPO sebagai enzim kasar.

Terhadap 40 mL, enzim kasar ditambahkan sedikit demi sedikit Aseton dingin sejumlah 64 mL. Proses pengendapan dilakukan dalam ruang dingin pada suhu 10°C dan campuran kemudian dibiarkan selama 30 menit. Endapan Aseton dipisahkan dengan cara sentrifus (3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit), kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer tris 0,05 M pada pH 7,8 dengan perbandingan 4 gram : 150 mL larutan buffer. Selanjutnya di-dialisis dalam wadah yang berisi larutan 0,05 M buffer tris pH 7,8 pada suhu 4-10°C selama 8 jam.

Penentuan Konsentrasi Protein

Aktivitas spesifik enzim ditentukan dengan terlebih dahulu mengukur kadar protein masing-masing enzim kasar, fraksi aseton dan enzim murni. Kadar protein diukur dengan mengikuti metoda Lowry. Sebanyak 0,5 mL enzim dicampur dengan 5 mL pereaksi CuSO_4 , kemudian dikocok lalu di inkubasi selama 10 menit ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu. Serapan diukur pada panjang gelombang 760 nm dan sebagai standar digunakan Bovin Serum Albumin (BSA).

Pengukuran Aktivitas Polifenol Oksidase

Aktivitas PPO ditentukan dengan metoda Varda Kahn yang dimodifikasi dengan menggunakan katekol dan klorogenat sebagai substrat pada pH 6 - 8, waktu inkubasi selama 1 menit dalam penangas air.

pH Optimum

Aktivitas PPO sebagai fungsi pH ditentukan dengan menggunakan katekol dan klorogenat sebagai substrat dalam larutan buffer Natrium Fosfat 0,1 M (pH 6 - 8).

Suhu Optimum

Penentuan pengaruh suhu terhadap aktivitas PPO dilakukan pada kondisi pH optimum, larutan campuran di inkubasi selama 1 menit dalam penangas air dengan variasi suhu 25-40°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Pemurnian PPO

Pemurnian PPO kentang dilakukan secara parsial yakni terhadap enzim kasar dilakukan fraksinasi dengan aseton. Endapan aseton kemudian didialisis dalam buffer Tris, pH 7,3. Aktivitas dan protein yang diekstrak ternyata bervariasi sesuai dengan medium yang digunakan (Tabel 1).

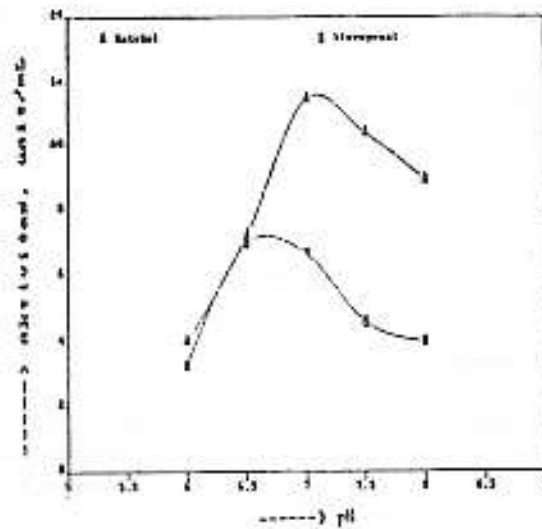
Tabel 1. Perubahan aktivitas dan aktivitas spesifik PPO kentang selama proses pemurnian

Tahap	Aktivitas (Unit/mL)	Protein (mg / mL)	Aktivitas spesifik (Unit/mg)	Kelipatan kemurnian
Enzim kasar	10.6	0.04	265	1
Aseton	14.64	0.025	424	1.6
Dialisis	15.93	0.023	692	2.6

Setiap tahap pemurnian parsial ini nampaknya tidak terjadi perubahan yang berarti. Kelipatan kemurnian yang dicapai pada masing-masing tahap adalah hasil bagi aktivitas spesifik terhadap aktivitas awal. Nilai ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan enzim kasar melalui fraksinasi amonium sulfat 55% (Masdiaty, 1993).

Pengaruh pH

Aktivitas PPO naik dari pH 6 dan memperlihatkan nilai maksimum pada pH 7, selanjutnya berangsur turun dengan bertambahnya pH sampai 8 untuk katekol sebagai substrat. Sedangkan substrat klorogenat, aktivitas PPO naik dari pH 6 mencapai maksimum 6.5, kemudian turun sampai pengukuran pH 8. (Gambar 1)



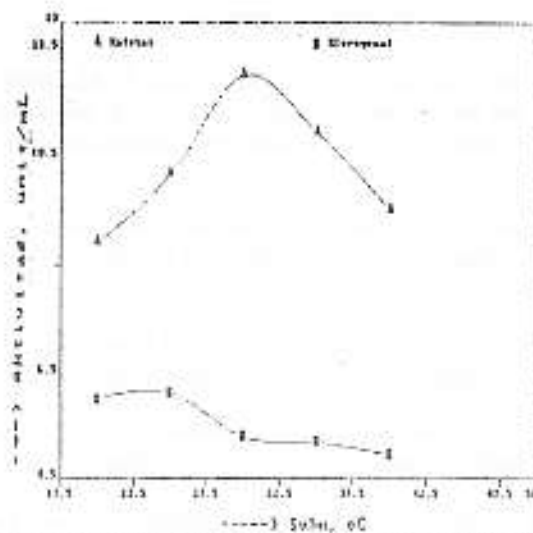
Gambar 1. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas PPO Kentang

Kondisi pH optimal ini berbeda bila digunakan tyrosin sebagai substrat yakni pH 8.2 (Sanchez, 1993). Penurunan aktivitas diatas dan dibawah pH optimum disebabkan oleh berkurangnya kestabilan enzim pada kisaran pH tersebut.

Enzim yang sama terkadang memperlihatkan pH optimum yang berbeda tergantung asal enzim dan parameter lainnya, diantaranya jenis dan konsentrasi substrat. PPO ubi jalar [*Iporocea batatas (L.) Lam.*] memberikan pH optimum terhadap aktivitasnya sebesar 4.5 dan 6.5 untuk substrat asam klorogenat dan katekol (Lourenco, 1992).

Temperatur Optimum

Temperatur optimum yang memberikan aktivitas PPO maksimal adalah pada 30°C untuk substrat katekol dan 25°C untuk substrat klorogenat (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas PPO Kentang.

Perubahan suhu mempengaruhi reaksi enzimatik baik terhadap stabilitas maupun afinitas enzim serta kecepatan disosiasi kompleks enzim substrat. Keadaan ini juga tergantung kepada struktur enzim yang terlibat. Perubahan suhu juga akan mempengaruhi pelarutan oksigen yang dibutuhkan enzim dalam aktivitasnya.

Nilai V_{maks} dan K_m

Hasil pengamatan laju reaksi pencoklatan maksimum oleh enzim PPO menggunakan substrat katekol (0.5-3.0mM), 30°C, pH 7, waktu inkubasi 1 menit dan klorogenat (0.5-3.0mM), 25°C, pH 6.5 waktu inkubasi 1 menit tercantum pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai V_{maks} dan K_m Dari PPO Kentang untuk Dua Substrat Fenolik

Substrat	V_{maks} (% klorogenat)	K_m , mM
Klorogenat	100	4.02
Katekol	65.5	1.05

Nilai K_m ini lebih rendah dan kontras dibandingkan PPO dari ubi jalar, substrat yang sama. Sedangkan nilai V_{maks} klorogenat 50% lebih besar dari katekol (Lourance, 1992).

DAFTAR PUSTAKA

- Galeazzi M. A. M., Sgarbieri V. C., Constatinides S. M. (1981) Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oksidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L), *J. Food Sci.*, 46:150.
- Kermasha S., Mireille G., Alan M. (1993) Studies on Inhibition of Mushroom Polyphenol Oxidase Using Chlorogenic Acid as Substrate, *J. Agric. Food Chem.* 41, 526-531.
- Lourenco E. J., Valdir A. N., Maraiza A. D. (1993) Polyphenol Oxidase from Sweet Potato: Purification and Properties, *J. Agric. Food Chem.* 40, 2369-2373.
- Masdiaty, (1993) Studi Kinetika Reaksi Enzimatis Polifenol Oksidase yang Dipengaruhi Inhibitor NaCl, FMIPA-UNAND Padang.
- Paulson A. T., J. Vanderstoep, S. W. Poirri. (1980) Enzymatic Browning of Peaches: Effect of Gibberellic Acid and Ethephon on Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity, *J. of Food Sci.*, 45, 341-351.
- Sanchez A. dlk, (1988) Characterization of Catecholase and Cresolase Activities of Monastrell Grape Polyphenol Oxidase, *Phytochemistry*, 27, 2, 319-321.