

MEKANISME INHIBISI ENZIM POLIFENOL OKSIDASE PADA SARI BUAH MARKISA DENGAN SISTEIN DAN ASAM ASKORBAT¹

Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unand

ABSTRACT

The mechanism of polyphenol oxidase enzyme inhibition was studied by isolation of enzyme from the passion fruit juice (*Passiflora Sp*). The extracted enzyme polyphenol oxidase has an optimum activity at pH 5,6 and temperature of 30⁰ C using a pirogalol substrate. The pattern of inhibition of the enzyme polyphenol oxidase studied using cysteine and ascorbic acid. Cystein of 10 mM concentration can inhibit the enzyme polyphenol oxidase activity as 97.25%, ascorbic acid with the same concentration can inhibit the enzyme polyphenol oxidase 96.5%. The pattern of inhibition of cysteine is more likely to be competitive, while non-competitive with ascorbic acid.

Keyword: *polyphenol oxidase, inhibition, cysteine, ascorbic acid*

PENDAHULUAN

Polifenol oksidase (PPO) EC 1.14.18.1 adalah suatu enzim yang termasuk pada golongan oksidoreduktase yang mengkatalisis proses hidrosilasi senyawa monofenol menjadi senyawa difenol, kemudian dilanjutkan dengan mengkatalisis proses oksidasi difenol menjadi kuinon. Senyawa kuinon yang terbentuk sangat reaktif sehingga akan mengalami reaksi polimerisasi menghasilkan pigmen merah, coklat dan hitam yang disebut pigmen melanin. Kesemuanya ini menampilkan warna kecoklatan pada jaringan buah-buahan dan sayur-sayuran yang memar^[1].

Pada sel tumbuhan, enzim ini terdapat di dalam vakuola sel dan letaknya terpisah dengan senyawa-senyawa fenol yang terdapat dalam tumbuhan tersebut. Inilah sebabnya reaksi pencoklatan akan terjadi hanya jika jaringan atau selnya rusak. Fungsi dari enzim PPO ini dalam sel yang utuh belum diketahui secara pasti, diperkirakan enzim ini berfungsi sebagai pemacu biosintesis lignin atau berpartisipasi dalam perlindungan mekanik dari jaringan tumbuhan yang luka atau memar^[2].

Pencoklatan enzimatis pada buah dan sayuran dalam proses pengolahan merupakan masalah yang serius, karena bagian yang terkelupas dan dipotong akan cepat menjadi gelap warnanya

ketika terkena udara. Hal ini tidak diinginkan karena menampilkan warna serta rupa yang tidak bagus dan diiringi rasa yang tidak enak. Proses pencoklatan yang terjadi akan mengurangi kualitas produk dan menurunkan minat konsumen^[2,3].

Reaksi pencoklatan enzimatis pada buah dan sayuran dapat diatasi dengan menghambat enzim PPO. Penghambat ini harus memperhatikan hal-hal yang dapat mempengaruhi rasa, keamanan dan nilai ekonomisnya. Cara-cara yang pernah dipakai untuk menghambat reaksi enzimatis ini antara lain dengan memanaskan, mengurangi kontak dengan oksigen serta penggunaan senyawa-senyawa kimia.

Peristiwa pencoklatan akibat oksidasi oleh enzim PPO ini juga terjadi pada buah markisa (*Passiflora Sp*). Buah markisa selain enak dimakan segar, juga banyak dikonsumsi dalam bentuk sari buah. Enzim PPO yang ada pada sari buah mengakibatkan warna yang dihasilkan kurang menarik (kuning kusam) selain perubahan cita rasanya. Hal ini mengakibatkan rendahnya mutu sari buah markisa serta kurang menarik bagi konsumen. Untuk mengatasi hal tersebut pada percobaan ini digunakan senyawa kimia seperti asam askorbat dan sistein untuk menghambat daya katalitik enzim PPO sari buah markisa^[3,5,6].

Mekanisme reaksi inhibisi enzim PPO sari buah markisa dengan menggunakan inhibitor asam askorbat, dan sistein belum jelas. Secara umum mekanisme inhibisi dapat dibedakan atas inhibisi kompetitif, inhibisi nonkompetitif dan inhibisi unkompetitif. Pada jenis inhibisi kompetitif, inhibitor menyebabkan berubahnya harga K_m menjadi lebih besar dari harga K_m semula, sedangkan V_{maks} nya tetap. Adanya inhibitor menyebabkan enzim membutuhkan konsentrasi substrat yang lebih besar, untuk mencapai kecepatan maksimum. Inhibisi nonkompetitif, inhibitor menyebabkan turunnya harga V_{maks} , tanpa mengubah harga K_m enzim terhadap substrat. Penambahan substrat pada jenis inhibisi nonkompetitif tidak mengurangi hambatan. Secara kinetik inhibisi kompetitif dan inhibisi nonkompetitif dapat dijelaskan dengan mengukur laju kecepatan reaksi pada berbagai konsentrasi substrat dan inhibitor. Pada inhibisi kompetitif titik potong kedua grafik pada sumbu Y, sedangkan pada inhibisi nonkompetitif titik potong kedua grafik pada sumbu X. Inhibisi unkompetitif titik potong kedua grafiknya tidak pada sumbu Y maupun sumbu X^[4,7,8].

METODOLOGI

Alat-alat

Alat-alat gelas yang umum dilaboratorium kimia, saringan teh, sentrifuge incubator, pH, meter stirer, spektrofotometer UV-Vis.

Bahan

Buah markisa (*Passiflora sp*) diperoleh dari Pasar Raya Padang, aseton, buffer fosfat, KCl, amonium sulfat, asam askorbat, sistein, pirogalol.

Ekstraksi Enzim PPO dari sari buah Markisa:

Buah dikupas dan dikumpulkan isinya lebih kurang 200 g, masukkan dalam saringan teh kemudian gerus dan tampung dengan 100 ml buffer fosfat 0,01 M pH 7 yang ditambah beberapa tetes larutan sistein 0,01M dalam kondisi suhu rendah. Biarkan satu malam dalam kulkas, kemudian disentrifuge pada 8000 rpm. Selanjutnya supernatan ditambahkan 30 ml larutan KCl 1 % distirer

selama 30 menit, kemudian disentrifugasi kembali dan diambil supernatnya.

Pemurnian Enzim PPO sari buah Markisa

Supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim diambil 100 ml ditambahkan aseton dingin secara bertahap sebanyak 100 ml kemudian dibiarkan selama satu malam dan dipisahkan endapan dengan supernatan, endapan diambil dan dilarutkan dalam buffer fosfat 0,01 M pH 7.

Penentuan aktifitas enzim polifenol oksidase

Aktifitas polifenol oksidase ditentukan dari laju reaksi oksidasi substrat pirogalol dengan adanya polifenol oksidase yang membentuk produk berwarna coklat. Intensitas warna coklat ini diamati dengan spektrofotometer pada panjang 420 nm. Satu unit enzim didefinisikan sebagai kenaikan absorban 0,001 permenit persatuan waktu pada panjang gelombang 420 nm^[4].

Penentuan kondisi optimum aktifitas enzim polifenol oksidase

Kondisi optimum aktifitas polifenol oksidase dilihat pada suhu 25 –40 °C dan pH 5- 8 dengan konsentrasi substrat pirogalol 0,5 M, yang diamati dengan perubahan aktifitas enzim pada setiap perlakuan yang bervariasi. Aktifitas polifenol oksidase yang diperoleh identik dengan laju maksimum reaksi pencoklatan (V_{mak}).

Penentuan tingkat dan tipe inhibisi dari masing-masing inhibitor

Tingkat dan tipe inhibisi dari inhibitor ditentukan dengan cara menambahkan inhibitor dengan konsentrasi bervariasi pada reaksi enzimatik antara polifenol oksidase dengan substrat pirogalol yang juga konsentrasinya bervariasi. Pengujian dilakukan terhadap % Inhibisi, harga V_{maks} sebelum dan saat inhibisi, K_m (Konstanta Michelis – Menten) tanpa inhibitor dan dengan inhibitor (K_i). Persentase inhibisi ditentukan pada konsentrasi substrat pirogalol optimum dan konsentrasi inhibitor bervariasi dari 2,5 – 10 mM

HASIL DAN PEMBAHASAN

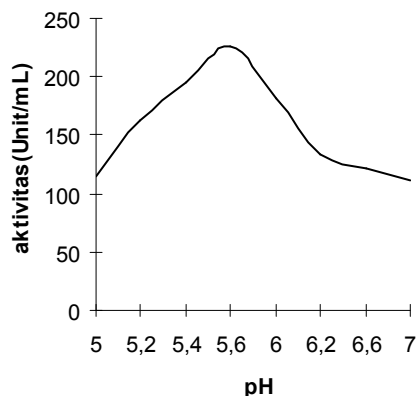
Pemurnian enzim hasil ekstraksi dengan menggunakan aseton kejenuhan 30-60 % dapat meningkatkan kemurnian enzim sebanyak 2 kali. Pemakaian aseton dengan kejenuhan 50 – 80 % dapat meningkatkan kemurnian 4 kali. Aktifitas enzim meningkat seiring dengan bertambahnya tahap pemurnian. Ini memperlihatkan konsentrasi enzim dalam larutan makin meningkat.

Pengaruh pH terhadap aktifitas enzim PPO sari buah markisa

Pengujian aktifitas enzim terhadap perubahan pH dilakukan pada suhu 27^oC, konsentrasi pirogalol 0,5 mM dengan waktu inkubasi 30 menit.

Tabel 1 . Hasil pengujian aktifitas ekstrak kasar dan beberapa tahap pemurnian Enzim PPO.

Tahapan Pemurnian	Vol (ml)	Aktifitas (Unit/mL)	Protein (mg/ml)	Aktifitas Spesifik (Unit/mg)	Tingkat Kemurnian (X)
Ekstrak Kasar	200	224	0,309	725	1
Aseton (30 –60%)	100	186	0,116	1603	2
Aseton (50 –80 %)	150	235	0,078	3012	4



Gambar 1. Kurva pengaruh pH terhadap aktifitas enzim PPO sari buah markisa

Dari Gambar 1, dapat dilihat pH optimum enzim PPO sari buah markisa untuk substrat pirogalol adalah 5,6. Penurunan aktifitas enzim di atas dan di bawah pH optimum disebabkan oleh perubahan muatan dari gugus amino enzim. Pada pH rendah enzim akan terprotonasi sehingga kehilangan muatan negatifnya. Pada pH tinggi substrat akan terionisasi sehingga kehilangan muatan

positifnya. Perubahan muatan inilah yang menyebabkan menurunnya aktifitas enzim.

Pengaruh Suhu terhadap aktifitas Enzim PPO Sari buah markisa

Setiap enzim mempunyai suhu optimum yang spesifik yaitu suhu dimana aktivitas enzim maksimum. Dari hasil yang telah didapatkan

suhu optimum enzim PPO sari buah markisa dengan substrat pirogalol adalah 30°C.

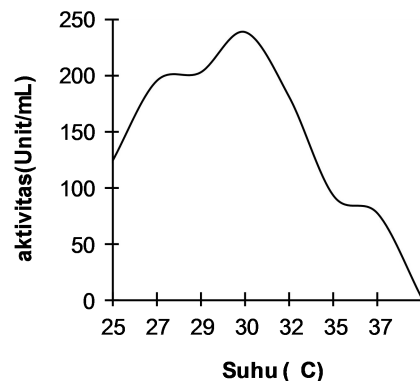
Perubahan suhu mempengaruhi reaksi enzimatik maupun terhadap stabilitas enzim, afinitas enzim serta kecepatan disosiasi kompleks enzim substrat. Dibawah suhu optimum enzim memiliki aktifitas yang rendah, karena belum semua enzim teraktivasi, sedangkan diatas suhu optimum aktifitas enzim menurun karena enzim mengalami denaturasi.

Hasil Pengukuran aktifitas enzim PPO dengan menggunakan inhibitor

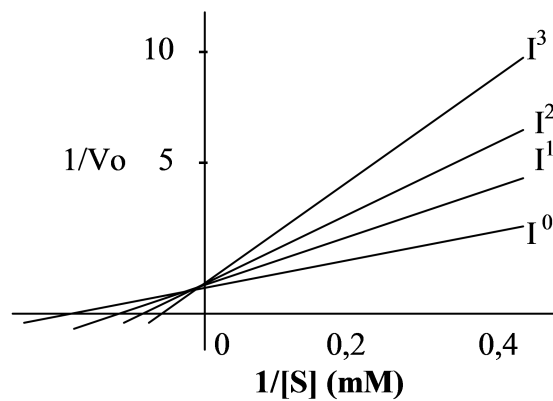
Mekanisme reaksi penghambatan sistein bersifat kompetitif, hal ini ditandai dengan berubahnya harga K_m , jika konsentrasi substrat diperbesar. Pada konsentrasi 10 mM sistein mampu menghambat aktifitas polifenol oksidase 97,25 %. Sistein merupakan asam amino yang mempunyai gugus sulfhidril, gugus ini berinteraksi dengan produk o-quinon membentuk senyawa Cystein Quinon Addition Compound (CQAC), yang mengakibatkan senyawa melanoidin berwarna coklat tidak terbentuk. CQAC mempunyai struktur mirip

dengan substrat, sehingga CQAC juga dapat berikatan dengan pusat aktif enzim berkompetisi dengan substrat, sehingga sistein dapat bersifat inhibitor kompetitif.^[6] Disamping itu sistein dapat juga menghambat aktifitas enzim polifenol oksidase dengan membentuk kompleks yang stabil dengan Cu yang merupakan kofaktor enzim, sehingga enzim menjadi tidak aktif.^[3,6]

Mekanisme reaksi penghambatan asam askorbat bersifat non – kompetitif, hal ini ditandai dengan bertambah besarnya konsentrasi substrat harga K_m tidak mengalami perubahan. Asam askorbat mempunyai daya inhibisi 96,5 % untuk konsentrasi 10,0 mM. Kerja asam askorbat sebagai inhibitor berbeda dengan sistein. Asam askorbat mereduksi kembali o-quinon yang terbentuk menjadi senyawa fenol dimana asam askorbat melepaskan 2 molekul hidrogennya dengan membentuk dehidroasam askorbat. Dengan terbentuknya senyawa fenol kembali maka reaksi lanjutan pembentukan melanin dari quinon tidak berlangsung.^[9]



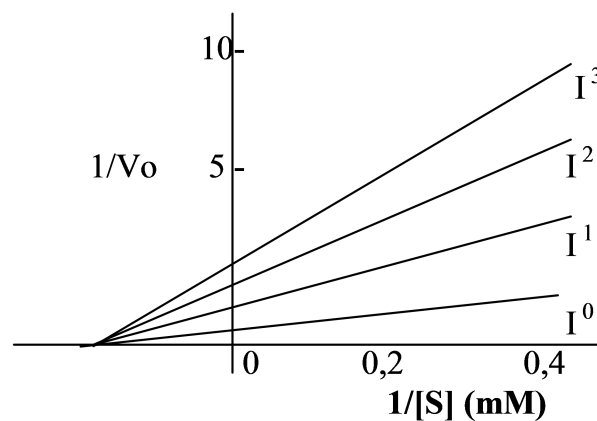
Gambar 2. Kurva pengaruh suhu terhadap aktifitas enzim PPO sari buah markisa



Gambar 3. Kurva inhibisi sistein terhadap aktifitas enzim polifenol oksidase dengan substrat pirogalol

Keterangan :

- I⁰ = Konsentrasi sistein 0 m M (% I = 0 %)
- I¹ = Konsentrasi sistein 2,5 m M (% I = 32 %)
- I² = Konsentrasi sistein 5,0 m M (% I = 67 %)
- I³ = Konsentrasi sistein 10,0 m M (% I = 97,25 %)



Gambar 4 : Kurva inhibisi asam askorbat terhadap aktifitas enzim polifenol oksidase dengan substrat pirogalol

Keterangan:

- I⁰ = Konsentrasi asam askorbat 0 m M (% I = 0 %)
- I¹ = Konsentrasi asam askorbat 2,5 m M (% I = 20 %)
- I² = Konsentrasi asam askorbat 5,0 m M (% I = 67 %)
- I³ = Konsentrasi asam askorbat 10,0 m M (% I = 96,5 %)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut : 1) Dari sari buah markisa (*Passiflora sp*) dapat diekstrak enzim polifenol oksidase, 2) Kondisi optimum dari enzim polifenol oksidase sari buah markisa pada pH 5,6, dan suhu 30 ° C dengan substrat pirogalol, 3) Sistein dengan konsentrasi 10 mM dapat menghambat aktifitas enzim polifenol oksidase sampai 97,25 %., sedangkan asam askorbat dengan

konsentrasi yang sama dapat menghambat enzim polifenol oksidase 96,5 %, 4) Mekanisme reaksi inhibisi sistein terhadap aktifitas enzim polifenol oksidase adalah kompetitif, sedangkan asam askorbat mekanismenya nonkompetitif

DAFTAR PUSTAKA

1. A. M. Mayer, Polyphenol Oxidases in Plant Recentprogress, *Phytochemistry*, 26, 11-20.

2. J. Klapp, A.H. Ricchard F.C., Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase, *J.Food Chem*, 38: 926 – 931, (1990).
3. Molnar, I. Perl, M. Friedman, Inhibition of Browning bu Sulfur Amino Acid. 3. Apples and Potates, *J. Agric. Food Chem*, 38: 1652, (1990).
4. E.J. Lowrenco, Polyphenol Oxidase from Sweet Potato Purification and Properties, *J.Agric Food Chem*, 40: 2369–2373. (1992).
5. J.R. Chan, *Passion Fruit in Tropical and Sub Tropical Fruit*, John Willey and Sons Inc, (1978).
6. F. C. Richard Forged, and P.M. Goupy Cystein as inhibition of Enzymatic Browning .2. *Kinetic Studies J.Agric Food Chem*,41: 532- 536, (1993).
7. M. Y. Coseteng, C.Y. Lee, Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning , *J.Food Sci* 52: 985-989, (1987).
8. S. Kremasha, Studies on Inhibitor Mushroom Polyphenol Oxidase using Chlorogenic Acid as Substrat., *J.agric. Food Chem*, 41: 526-531, (1993).
9. Eskin, *Biochemistry of Foods*, Academic Press, New York, 70-83, (1971).