

INHIBISI OKSIDASI KATEKOL DENGAN POLIFENOL OKSIDASE (PFO) KENTANG OLEH FRAKSI ETIL ASETAT KLUWEK DAN BHT

Susellowati; Sumi Hudlyono dan Silvia Sugito

Jurusan Kimia FMIPA
Universitas Indonesia

Diterima : 3 September 2002

; Disetujui : 28 Oktober 2002

ABSTRAK

Reaksi pencoklatan ("browning reaction") pada buah-buahan dan sayur-sayuran berlangsung karena adanya polifenol oksidase (PFO). Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas polifenol oksidase yang diisolasi dari kentang serta pengaruh inhibisi dari penambahan fraksi etil asetat kluwek dan BHT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas optimum PFO adalah pada pH 6,4 dan [katekol] = $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. Aktivitas inhibisi optimal fraksi A (netral) dengan kadar 0,05 % mampu menurunkan pembentukan quinon sampai 66,29 %, fraksi B (asam lemah) dengan kadar 0,05 % dengan penurunan 48,59 %, sedangkan fraksi C (asam kuat) dengan penambahan 0,10 % mampu menurunkan 55,62 %. Namun demikian aktivitas tersebut masih lebih rendah dari BHT. Urutan efektivitas inhibisinya adalah BHT > A > C > B. Bila dibandingkan dengan studi inhibisi fraksi yang sama untuk oksidasi asam linoleat oleh lipoksidase memberikan urutan efektivitas inhibisinya adalah fraksi B > C > A. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun penginhibisinya sama tetapi efektivitasnya sangat ditentukan oleh reaksi katalisisnya yaitu enzim dan substratnya.

STUDY OF OXIDATION CATECHOL BY POTATO POLYPHENOLOXIDASE (PFO) INHIBITED BY KLUWEK FRACTIONS AND BHT : The enzymatic browning reaction of fruits and vegetables are catalysed by polyphenoloxidase (PFO). Study was carried out to observe the PFO optimal activity condition and the inhibition effect of kluwek fraction (*Pangium edule* Reinw. fractions) and BHT. The optimum inhibition was observed in addition of 0.05 % fraction A (neutral), 0.05 % fraction B (weak acid) and 0.10 % fraction C (strong acid) that decreased the formation of quinon by 66.29 %, 49.59 % and 55.62 % respectively. The inhibition activity is BHT > A > C > B and it's totally different with the inhibition study of linoleic oxidation by lipoxidase which the activity is B > C > A. It is mean that the inhibition not only determined by the kind of inhibitor but meanly by the kind of enzymatic reaction (enzyme and substrate).

Keywords : catechol, quinon, polyphenoloxidase, inhibition, kluwek fractions, BHT.

I. PENDAHULUAN

Reaksi pencoklatan ("browning reaction") pada buah-buahan dan sayur-sayuran bisa terjadi baik melalui reaksi oksidasi biasa maupun reaksi enzimatik. Enzim yang menyebabkan reaksi pencoklatan ini adalah oksigen oksidoreduktase, yang dikenal juga sebagai katekolase, tirosinase, fenolase dan polifenol oksidase (PFO). PFO adalah suatu enzim oksidase yang mengoksidasi monofenol menjadi difenol dan kemudian menjadi o-quinon. o-Quinon ini dapat bereaksi dengan o-quinon yang lain, asam-asam amino, gula pereduksi, dan lain-lain, membentuk polimer yang mengendap atau membentuk warna yang gelap (Oregon State University, 1988a). Reaksi pencoklatan ini dapat menyebabkan perubahan gizi serta rasa dari buah atau sayuran tersebut, (Zawistowski, 1990; Robertson & Christiansen, 1996; Hwang et al, 2001).

Tingkat pencoklatan bergantung pada konsentrasi dan sifat alami dari polifenol yang ada. Namun secara umum aktivitas enzimatik menentukan kapasitas pencoklatan yang terjadi. Reaksi pencoklatan pada apel, aprikot, peach dan pir membentuk warna coklat tetapi tidak pernah berubah sampai hitam, sedangkan pisang dan kentang mula-mula berubah menjadi merah muda dan kemudian coklat dan akhirnya menjadi hitam. Kematangan dari suatu buah juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pencoklatan, (Oregon State University, 1988b). Jumlah PFO dalam tanaman juga bergantung pada spesies, kondisi tanah, kematangan dan umur tanaman tersebut. Selain itu metode preparasi yang berbeda dapat memberikan efek pencoklatan yang berbeda. Pada kentang yang dipotong dengan pisau akan memberikan efek pencoklatan yang sedikit pencoklatan dibanding kentang parut, karena pisau merusak lebih sedikit jaringan daripada parut.

PFO sangat mudah terdekomposisi pada temperatur biasa dan akibatnya sulit untuk diisolasi. Ada bermacam enzim yang dapat mengkatalisis oksidasi fenol dan turunannya dengan oksigen, tetapi tidak semua enzim pengoksidasi dapat mengkatalisis oksidasi fenol yang sama. Sebagai contoh ekstrak kasar enzim PFO yang ada dari pohon zaitun hanya akan mengkatalisis fenol *o*-dihidroksi, sedangkan ekstrak kasar enzim PFO pada apel hanya dapat mengkatalisis katekol dan pirogallol tetapi tidak hidroquinon, resorsinol, atau fenol. Berdasarkan kenyataan tersebut dapat dikatakan bahwa polifenol oksidase yang ada pada jaringan buah-buahan tidak selalu identik dan substratnya pun akan berbeda pada tanaman yang berbeda, (Meyer & Harel, 1986).

Penelitian ini merupakan lanjutan studi aktivitas antioksidatif fraksi etil asetat dari kluwek (*Pangium edule* Reinw.), (Hudiyo et al, 2001, 2002). Tujuan dari penelitian ini adalah ingin melihat efek penambahan fraksi etil asetat (fraksi A, B, dan C) dari kluwek pada reaksi oksidasi katekol oleh enzim PFO hasil isolasi dari kentang (*Solanum tuberosum*).

II. BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan. Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari metanol pa, etil asetat pa, katekol, NaHCO_3 5%, HCl 5 N, aseton pa, H_2O bebas mineral, buffer natrium fosfat, NaOH 5% pH = 13, silika gel dari E Merck. Kluwek dan kentang diperoleh dari pasar tradisional Depok. Peralatan laboratorium yang digunakan sesuai dengan keperluan dan yang tersedia di Jurusan Kimia, FMIPA-UI, Depok.

Fraksionasi Kluwek. Ekstraksi dan fraksionasi kluwek dilakukan dengan metode yang telah dilaporkan sebelumnya, (Hudiyo et al, 2002).

Isolasi Enzim PFO dari kentang. Kentang sebanyak 250 g yang sudah dipotong-potong kecil dimasukkan ke dalam blender, kemudian ditambahkan 250 mL aseton yang telah didinginkan terlebih dahulu. Setelah diblender selama 3 menit kemudian disaring dengan kain. Endapan yang diperoleh diblender lagi dengan penambahan 150 mL aseton, selama 3 menit dan disaring kembali. Endapan yang didapat berupa tepung aseton yang mengandung enzim PFO tersebut lantas diangin-anginkan sampai kiser. Selanjutnya sebanyak 10 g tepung aseton ini dimasukkan ke dalam 375 mL larutan buffer natrium fosfat 0,1 M pH 6,8; kemudian distirer selama 1 jam pada suhu 5-10°C. Larutan yang diperoleh selanjutnya disentrifuge pada 3000 rpm selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh disaring kembali dengan kertas saring Whatman no.1, diperoleh filtrat yang merupakan enzim kasar PFO. Secara ringkas skema isolasi PFO ditampilkan pada Gambar 1. (di halaman 49).

Penentuan panjang gelombang maksimum reaksi. Panjang gelombang (λ) maksimum dari katekol (substrat) dan quinon (produk oksidasi) ditentukan dengan spektrofotometer pada daerah UV/Vis.

Penentuan pH optimum, (Duckworth & Coleman, 1970; Rivas, 1970). Sejumlah sample dengan volume total 5,0 ml terdiri dari kontrol (K1 dan Ko), serta variasi sample yang diuji. K1 dibuat dengan cara menambahkan sejumlah 0,5 ml larutan PFO pada 4,5 ml akuades bebas mineral. Sampel Ko dibuat dengan cara mencampurkan 2,0 ml larutan buffer fosfat 0,1 M pada pH yang sesuai, dengan 2,0 ml larutan katekol $2,0 \cdot 10^{-3}$ M dan 1,0 ml akuades. Sedangkan sample (S) dibuat dengan cara mencampurkan 2,0 ml larutan buffer, 2,0 ml larutan katekol, 0,5 ml akuades dan 0,5 ml larutan PFO. Seluruh preparat dibuat secara duplo. Sedangkan K1 dan S dibuat juga untuk penambahan buffer fosfat pada pH 6,0; 6,4; 6,8; 7,2 dan 7,6. Seluruh sample uji kemudian diinkubasi pada 30° C selama 30 menit. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan mematikan aktivitas enzim dengan merendam tabung reaksi dalam air mendidih selama 3 menit. Aktivitas PFO diamati dengan spektrofotometer UV/Vis. pada λ maksimum quinon sebagai produk oksidasinya.

Penentuan [katekol] optimum. Sampel dipersiapkan dengan cara yang sama dengan menggunakan larutan buffer pada pH optimum yang diperoleh sebelumnya. Variasi konsentrasi substrat katekol yang diuji adalah $0,5 \cdot 10^{-3}$ M; $1,0 \cdot 10^{-3}$ M; $1,5 \cdot 10^{-3}$ M; $2,0 \cdot 10^{-3}$ M; dan $2,5 \cdot 10^{-3}$ M.

Pengaruh penambahan ekstrak etil asetat kluwek terhadap aktivitas PFO. Sampel dipersiapkan dengan cara yang sama dengan menggunakan larutan buffer pada pH dan [S] optimum yang diperoleh sebelumnya. Selanjutnya sampel uji ditambah dengan 0,5 ml ekstrak kluwek A, B, atau C dengan variasi kadar yang ditambahkan adalah 0,05 %; 0,10 %; 0,15 %; 0,20 % dan 0,25 %.

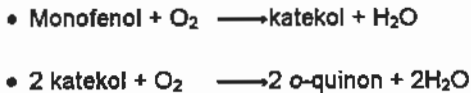
Pengaruh penambahan BHT (Antioksidan Sintetik Butil Hidroksi Toluena) terhadap aktivitas PFO. Sampel dipersiapkan dengan cara yang sama dengan menggunakan larutan buffer pada pH dan [S] optimum yang diperoleh sebelumnya. Sampel yang diuji ditambah dengan 0,5 ml BHT dengan variasi kadar yang ditambahkan adalah 0,05 %; 0,10 %; 0,15 %; 0,20 % dan 0,25 %.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksionasi kluwek. Hasil fraksionasi kluwek diperoleh fraksi dalam etil asetat yang berupa fraksi netral (A), fraksi asam lemah (B) merupakan hasil ekstraksi etil asetat total dengan NaOH 5 %, dan fraksi asam kuat (C) hasil ekstraksi dengan NaHCO_3 5 %, (Robinson, 1995).

Enzim PFO kentang. Hasil isolasi PFO berupa ekstrak enzim kasar dalam aseton yang akan diuji kondisi optimumnya terhadap perubahan

pH dan [S]. Polifenol oksidase mempunyai dua aktivitas katalitik, yaitu o-hidroksilasi dari monofenol dan oksidasi aerobik dari o-difenol, (Duckworth & Coleman, 1970; Rivas, 1977; Robertson & Christensen, 1996; Zawistowski et al, 1990).

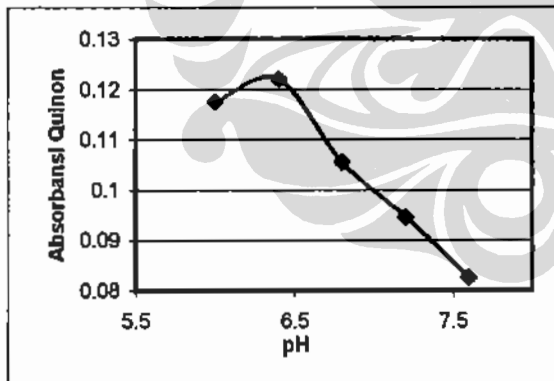


PFO terdapat dalam sel tanaman dan hewan. Fungsi biologi dari polifenol oksidase di sel tanaman tersebut belum diketahui, tetapi keberadaannya dapat diketahui dengan cepat pada saat terjadi luka. Ini disebabkan karena pembentukan dan oksidasi lanjutan dari quinon. Aktivitas PFO diamati berdasarkan pembentukan produk quinon dengan mengamati peningkatan serapan yang terjadi pada λ maksimumnya yaitu pada 473,6 nm.

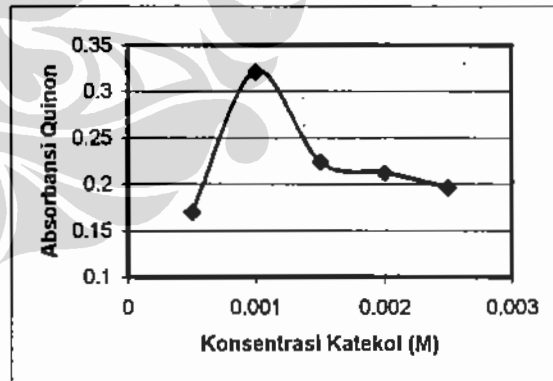
Penentuan pH optimum. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH lingkungan reaksinya. Pada pH reaksi yang terlalu rendah atau terlalu tinggi struktur tersier dan kuaterner enzim bisa terganggu dan akan mengakibatkan aktivitasnya menurun. Penentuan pH optimum diperlukan untuk mendapatkan aktivitas optimum PFO. Berdasarkan data pengamatan diperoleh pH optimum pada 6,4 seperti terlihat pada grafik hubungan antara aktivitas PFO dengan perubahan pH reaksi yang ditampilkan pada Gambar 2a. Selanjutnya pH 6,4

jumlah substrat yang dikatalisis. Jumlah enzim (E) yang ditambahkan dalam suatu reaksi adalah tertentu, biasanya dalam jumlah yang relatif kecil. Mekanisme reaksi enzimatik berlangsung melalui pembentukan produk antara ES yang jumlahnya bergantung pada jumlah E yang ditambahkan. Kenaikan [S] akan meningkatkan laju awal (v_o) reaksi sampai mencapai maksimum (v_{maks}) mulai penambahan [S] tertentu. Penambahan substrat lebih banyak tidak akan lagi meningkatkan laju reaksinya. Oleh karena itu penentuan [S] optimum perlu ditentukan dalam penelitian reaksi enzimatik, (Palmer, 1991). Berdasarkan data yang diperoleh yang ditampilkan sebagai grafik hubungan antara konsentrasi dengan aktivitas PFO didapatkan harga [S] optimal pada 1,0 10⁻³ M, Gambar 2b.

Pengaruh penambahan fraksi kluwek dan BHT terhadap aktivitas PFO. PFO adalah metaloenzim dengan kovaktor Cu, oleh karena itu aktivitas selain dipengaruhi oleh pH, [S], dan T, juga oleh adanya senyawa pereduksi (antioksidan), serta senyawa yang dapat berinteraksi dengan gugus prostetik Cu, (Shahidi & Nacz, 1992). Oleh karena itu penambahan fraksi etil asetat kluwek A, B atau C yang bersifat antioksidatif (Hudiyono, 2002) dan BHT diharapkan akan menurunkan aktivitas PFO. Hasil pengamatan studi aktivitas antioksidatif fraksi kluwek dan BHT ditampilkan pada Gambar 3. Penambahan fraksi A (netral) mencapai aktivitas inhibisi optimal pada kadar 0,05 % dan mampu menghambat pembentukan



(a)



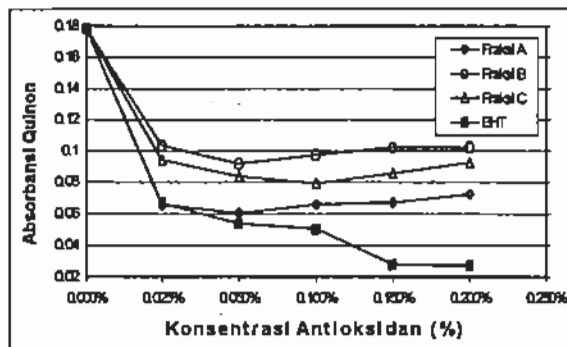
(b)

Gambar 2. Pengaruh perubahan (a) pH dan (b) konsentrasi substrasi katekol terhadap pembentukan produk oksidasi quinon, pH optimum = 6,4 dan [S] optimum 1,0 10⁻³ M.

digunakan untuk menentukan [S] optimum serta pengaruh penambahan ekstrak kluwek dan BHT. Penggunaan pH reaksi pada harga tertentu (optimum) akan menghindari variasi inhibisi pembentukan quinon oleh penambahan antioksidan dalam hal ini fraksi kluwek dan BHT, (Shahidi & Nacz, 1992).

Penentuan konsentrasi substrat optimum. Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh

quinon sampai 66,29 %. Penambahan fraksi B (asam lemah) optimal terjadi dengan kadar 0,05 % yang menghambat pembentukan quinon sebanyak 48,59 %. Sedangkan fraksi C (asam kuat) menghambat secara optimal pada penambahan 0,10 % dengan menurunkan pembentukan quinon sebanyak 55,62 %. Namun demikian bila dibandingkan dengan BHT ketiga aktivitas fraksi kluwek tersebut masih lebih rendah, bahkan



Gambar 3. Pengaruh penambahan fraksi kluwek dan BHT terhadap pembentukan produk oksidasi quinon.

semakin banyak BHT yang ditambahkan sifat inhibisinya semakin besar. Hal ini menunjukkan bahwa sifat inhibisi BHT lebih baik dibandingkan ketiga fraksi kluwek. Bila keempatnya kita bandingkan, maka didapatkan urutan efektivitas inhibisinya adalah BHT > A > C > B. Hasil ini sangat berbeda bila dibandingkan dengan studi inhibisi fraksi yang sama untuk oksidasi asam linoleat oleh lipoksidas yang didapatkan urutan efektivitas inhibisinya dengan urutan fraksi B > C > A, (Hudiyono et al, 2002).

IV. KESIMPULAN

Enzim polyfenol oksidase (PFO) kentang mempunyai aktivitas optimum pada pH 6,4 dan [katekol] = $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. Berdasarkan data efektivitas relatif dari inhibitor yang sama, dalam hal ini fraksi kluwek, tetapi untuk reaksi yang berbeda ternyata memberikan hasil yang berbeda. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa efektivitas reaksi inhibisi tidak hanya ditentukan oleh jenis inhibitorynya saja tetapi lebih ditentukan oleh jenis reaksi katalisisnya, yaitu jenis enzim dan substratnya.

DAFTAR ACUAN

Duckworth & J. Coleman. 1970. *Physico-chemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase*. J. Biol Chem. 245, 1613-1625.

Hudiyono, S., H. susilowati, S. Nurulita & D. Liliana. 2001. Inhibition activity of fermented *Pangium edule* Reinw (kluwek) fractions to the enzymatic oxidation of linoleic acid. *Proceeding of International Seminar on Natural Product Chemistry and Utilization of Natural Resources*, Depok June 5-7, 2001.

Hudiyono, S., Susilowati & S. Manahara. 2002. Pengaruh penambahan fraksi etil asetat kluwek terhadap oksidasi asam linoleat yang dikatalisis oleh lipoksigenase. *Sains Indonesia*, 7(1) : 11-15.

Hwang, T.Y., S.M. Son, C.Y. Lee & K.D. Moon. 2001. The relationship among flesh browning, polyphenol oxidase activity, and total phenolic contents in minimally processed potato (*Solanum tuberosum*). 1 hlm. <http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper 7773.html>, 13 Juli 2002, pk.12.33

Mayer, A.M & E. Harel. 1986. *Food chemistry*. 255-259.

Mayer, A.M & E. Harel. 1989. *Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables*. Departement of Botany, The Hebrew University of Jerusalem. Jerusalem, Israel.

Oregon State University Informations, Food Resource. 1998a. How enzymatic browning occurs. 1 hlm. <http://food.orst.edu/ffavor/phenol>, 13 Juli 2002, pk. 12.28.

Oregon State University. 1998b. What affects the amount of browning? 1 hlm. <http://food.orst.edu/>, 13 Juli 2002, pk. 13.36.

Palmer, Trevor. 1991. *Understanding Enzymes*. 3rd ed. Ellis Horwood, New York.

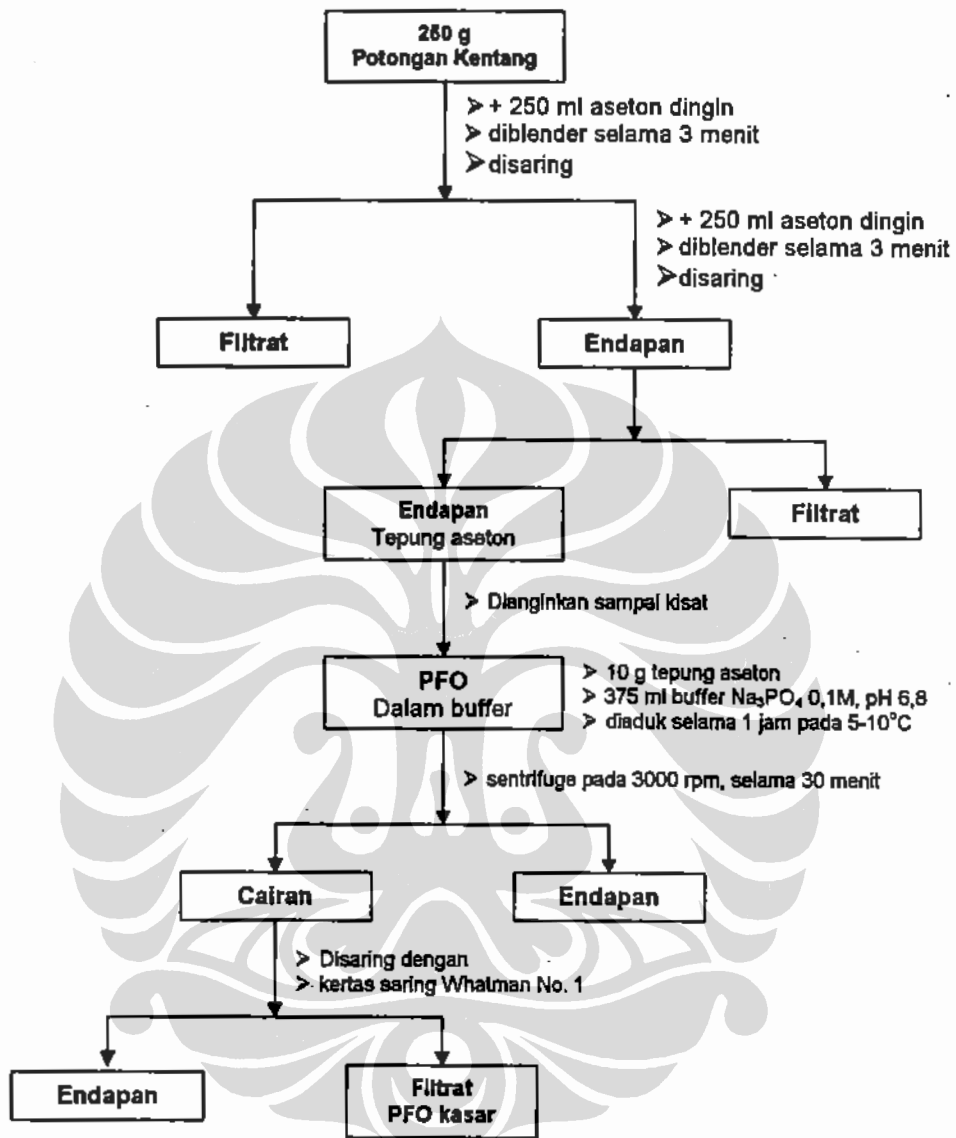
Rivas, Nile. 1977. Partial purification and characterization, kinetic of polyphenol oxidase of the cambur apple tree. 18 Mei : 10 hlm. http://redpav-fpolar.info.ve/fagro/v09_4/094m002.html, 13 Juli 2002, pk. 13.47.

Robertson, C & G. Christensen. 1996. Polyphenols, polyphenol oxidase, and enzymatic browning in foods due to the phenolic compounds reaction with polyphenoloxidase. 1 hlm. <http://food.orst.edu/>, 13 Juli 2002, pk. 13.07.

Robinson, T. 1995. *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Shahidi, F. & M. Naczk. 1992. *Food phenolics*. Technomic Publishing Company, Inc. Canada.

Zawistowski, J., C.G. Biliaderis & N.A. Michael Eskin. 1990. *Polyphenol oxidase*. Departement of Foods & Nutrition. Canada.



Gambar 1. Skema isolasi enzim PFO