

**KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR ENZIM POLYPHENOLOXIDASE
DARI UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)**

**CHARACTERIZATION OF CRUDE EXTRACT POLYPHENOLOXIDASE
ENZYME FROM BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)**

Made Suhandana¹, Tati Nurhayati^{1*}, dan Laksmi Ambarsari²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

*Email: tnurhayati@apps.ipb.ac.id; nurhayati7870@yahoo.com

²Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRACT

Shrimp is a very important export commodity with high market value world wide. However, it is still facing problem related to the waste and deterioration quality as main issues for the shrimp industry. In this experiment, polyphenoloxidase from the carapace of Penaeus monodon was extracted and characterized. The research was carried out to obtain the optimum extraction condition and to evaluate the properties of enzyme i.e., pH, optimum temperature for activating enzyme, kinetic enzyme, and chelating on metal ion. The best method for PPO enzyme extraction used buffer with 1:3 proportion. The optimum activity of enzyme was at pH 7 and temperature of 35°C. The kinematic enzyme (Km) value and the maximum substrate concentration were 5.42 mM and 7.5 mM, respectively. Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, and EDTA with concentration 5 and 10 mM inhibited enzyme activity. Cu²⁺ at concentration of 10 mM and Mn²⁺ at concentration 5 mM also inhibited enzyme activity

Keywords: carapace, characterization, polyphenoloxidase, shrimp

ABSTRAK

Udang merupakan komoditas ekspor yang penting, namun tidak luput dari permasalahan limbah dan kemunduran mutu yang dihadapi oleh hasil perikanan lainnya. Pada penelitian ini enzim *polyphenoloxidase* diekstraksi dan dikarakterisasi dari karapas *Penaeus monodon*. Penelitian dilakukan dengan menentukan optimasi ekstraksi, pH optimum dan suhu optimum aktivitas enzim, kinetika enzim, dan pengaruh pemberian ion logam. Metode terbaik untuk ekstaksi enzim PPO menggunakan perbandingan buffer 1:3 secara bertingkat. pH optimum kerja enzim PPO adalah 7 dengan suhu optimum 35 °C. Konsentrasi substrat untuk memperoleh aktivitas optimum enzim adalah 7,5 mM. Penghitungan kinetika enzim menunjukkan Km enzim PPO sebesar 5,42 mM. Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, serta EDTA dengan konsentrasi 5 dan 10 mM menghambat kerja enzim PPO, demikian juga dengan. Cu²⁺ 10 mM dan Mn²⁺ 5 mM menghambat kerja enzim PPO.

Kata kunci: karapas, karakterisasi, *polyphenoloxidase*, udang

I. PENDAHULUAN

Udang merupakan komoditas ekspor yang menjanjikan bagi Indonesia. Tingkat ekspor udang ke luar negeri yang tinggi menjadi sumber pendapatan yang tinggi pula bagi Indonesia. Ekspor udang Indonesia pada tahun 2010 mencapai volume 145.092 ton dengan nilai

mencapai US\$ 1.056.399.000 (KKP, 2011). Ekspor udang ke negara-negara Eropa dalam beberapa tahun terakhir mengalami penurunan. Penurunan ini disebabkan oleh adanya residu senyawa-senyawa antibiotik yang ditemukan pada udang. Selain adanya bahan kimia, penurunan ekspor udang ke luar negeri juga disebabkan oleh penurunan kualitas

dari udang yang akan diekspor terkait dengan kemunduran mutu.

Penampakan, bau, tekstur, dan nilai gizi adalah empat parameter yang dinilai oleh konsumen dalam memilih makanan. Penampakan dipengaruhi oleh warna, dan merupakan parameter pertama yang dinilai untuk mengevaluasi makanan. Warna dapat dipengaruhi oleh beberapa komponen, yaitu pembentukan pigmen, khlorofil, karotenoid, antosianin, dan lain-lain, atau pembentukan warna melalui reaksi enzimatik dan nonenzimatik. Salah satu reaksi warna yang penting adalah terbentuknya *browning* pada buah-buahan, sayur-sayuran, dan *seafood* khususnya krustasea (Kim *et al.*, 2000). Pembentukan *black spot* pada udang merupakan salah satu contoh pembentukan warna yang disebabkan oleh aktivitas enzim *polyphenoloxidase* (PPO) (Martinez and Whitaker, 1995).

Montero *et al.* (2001) menyatakan bahwa melanoisis adalah proses yang dipicu oleh mekanisme biokimia akibat oksidasi fenol menjadi quinon melalui kompleks enzim yang disebut *polyphenoloxidase*. Proses ini diikuti oleh polimerisasi nonenzimatik quinon sehingga menimbulkan senyawa pigmen dengan berat molekul tinggi dan sangat gelap. Proses kemunduran mutu pada udang terjadi saat *post mortem*. Walaupun timbulnya warna tidak berbahaya bagi konsumen, namun secara drastis mengurangi nilai jual produk dan menyebabkan kerugian yang cukup tinggi.

Penghambatan proses pembentukan *blackspot* dapat dilakukan menggunakan senyawa inhibitor. Senyawa inhibitor digunakan saat penanganan udang sehingga proses enzimatik sebagai tahap awal pembentukan melanin dapat dihambat. Penentuan senyawa inhibitor yang efektif dilakukan menggunakan uji aktivitas penghambatan secara *in vitro* dengan enzim PPO sebagai substratnya.

Oleh karena itu perlu dilakukan usaha untuk mengekstraksi PPO dari udang. Fakta menunjukkan bahwa PPO diperlukan untuk substrat pengujian, dan juga merupakan enzim yang penting bagi udang terutama dalam hal pembentukan cangkang baru. Selain itu enzim tersebut terlibat dalam hal penyembuhan luka. PPO juga berperan dalam pertahanan diri dan perlindungan terhadap serangan patogen. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengungkap potensi PPO tersebut.

Polyphenoloxidase pada udang banyak ditemukan pada bagian karapas udang (Montero *et al.*, 2001). Zamorano *et al.* (2009) menyebutkan bahwa PPO tertinggi ditemukan pada karapas, diikuti abdominal eksoskeleton, *cephalothorax*, pleopod, dan telson. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, ekstraksi PPO dapat dilakukan menggunakan karapas udang. Karapas udang merupakan salah satu jenis limbah yang dihasilkan dari proses pengolahan udang. Berdasarkan fakta tersebut ekstraksi enzim *polyphenoloxidase* dapat berperan sebagai alternatif pemanfaatan limbah udang. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi dan mengkarakterisasi enzim PPO yang dihasilkan dari karapas udang.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah karapas udang windu yang diperoleh dari pasar di daerah Bogor. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah akuades, buffer sodium fosfat (Merck), NaCl (Merck), Brij 35 (Merck), Buffer Tris-HCl (Applichem), L-DOPA (Sigma). Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sentrifuse (Sorvall), spektrofotometer (Yamato), pipet mikro (Axygen), inkubator (Thermoline), dan *Freezer*.

2.2. Ekstraksi Enzim *Polyphenoloxidase*

Ekstraksi dilakukan dengan mengacu modifikasi metode Simpson *et al.*, (1987). Sampel dibuat dalam bentuk bubuk menggunakan nitrogen cair dalam *waring blender*. Sampel (50 g) dicampur dengan 150 mL buffer (0,05 M buffer sodium fosfat, pH 7,2; yang mengandung 1,0 M NaCl dan 0,2% Brij 35. Campuran diaduk secara kontinu pada suhu 4 °C selama 30 menit, diikuti dengan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 x g pada suhu 4 °C selama 30 menit menggunakan sentrifuse dingin.

2.3. Penentuan Metode Ekstraksi Terbaik

Penentuan metode ekstraksi terbaik dilakukan dengan memodifikasi perbandingan sampel dengan buffer ekstraksi yang digunakan. Perbandingan yang digunakan antara lain 1:1, 1:2, 1:3, dan 1:3 secara bertingkat. Metode ekstraksi terbaik ditentukan dari nilai aktivitas spesifik enzim. Aktivitas enzim ditunjukkan dalam satuan U. Nilai 1U menunjukkan peningkatan absorban 0,001/ menit. Optimasi assay dilakukan dengan menguji waktu inkubasi saat pengujian. Suhu yang digunakan adalah 30 dan 35 °C. Pengujian aktivitas enzim berdasarkan metode Bono *et al.* (2010)

2.4. Penentuan Suhu dan pH Optimum

Suhu dan pH optimum ditentukan menggunakan metode Bono *et al.* (2010). Sampel enzim sebanyak 0,2 mL ditambahkan dengan 2,8 mL 0,01 M L-DOPA yang dilarutkan dalam 0,05 M buffer fosfat pH 6,5. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55 °C selama 5 menit. Sampel yang telah diinkubasi diukur pada panjang gelombang 475 nm. pH optimum ditentukan dengan melarutkan sampel enzim dalam 2,8 mL 0,01 M L-DOPA

yang dilarutkan dengan 0,05 M buffer fosfat pH 5, 6, 7, 8, 9. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu optimum yang telah diperoleh sebelumnya selama 5 menit.

2.5. Penentuan Kinetika Enzim

Kinetika enzim ditentukan menggunakan metode Bono *et al.* (2010). Sebanyak 0,2 mL enzim ditambahkan dengan 2,8 mL L-DOPA yang dilarutkan dalam 0,05 M buffer fosfat dengan pH sesuai pH optimum. Konsentrasi L-DOPA yang digunakan adalah 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mM. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu optimum yang telah diperoleh sebelumnya selama 5 menit. Sampel yang telah diinkubasi diukur pada panjang gelombang 475 nm.. Aktivitas enzim ditunjukkan dalam satuan U. Nilai 1U menunjukkan peningkatan absorban 0,001/ menit. Konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan Kecepatan maksimum (V_{maks}) ditentukan dengan plot Lineweaver-Burk.

2.6. Pengaruh Ion Logam dan Inhibitor terhadap Enzim

Pengaruh ion logam dan inhibitor terhadap enzim ditentukan menggunakan modifikasi metode Bono *et al.* (2010). Sampel enzim 0,2 mL ditambahkan dengan 0,2 mL larutan Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Na, Co^{2+} , *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) dilarutkan dalam 20 mM buffer Tris-HCl (pH 7,1). Masing-masing campuran diprainskubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Sebanyak 2,6 mL 0,01 M L-DOPA yang dilarutkan dalam 0,05 M buffer fosfat ditambahkan ke dalam campuran. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu optimum yang telah diperoleh sebelumnya selama 5 menit, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 475 nm.

2.7. Pengujian Aktivitas Enzim (Bono *et al.*, 2010)

Aktivitas *polyphenoloxidase* ditentukan dengan mereaksikan 0,2 mL enzim ditambahkan dengan 2,8 mL 0,01 M L-DOPA yang dilarutkan dalam 0,05 M buffer fosfat pH 6,5. Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 5 menit. Kemudian sampel yang telah diinkubasi diukur pada panjang gelombang 475 nm. Aktivitas enzim ditunjukkan dalam satuan U, dengan 1U berarti peningkatan absorban 0,001/menit.

2.8. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein ditentukan menggunakan metode Bradford (1976). Coomassie blue digunakan untuk pewarna dan bovine serum albumin digunakan sebagai standar.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

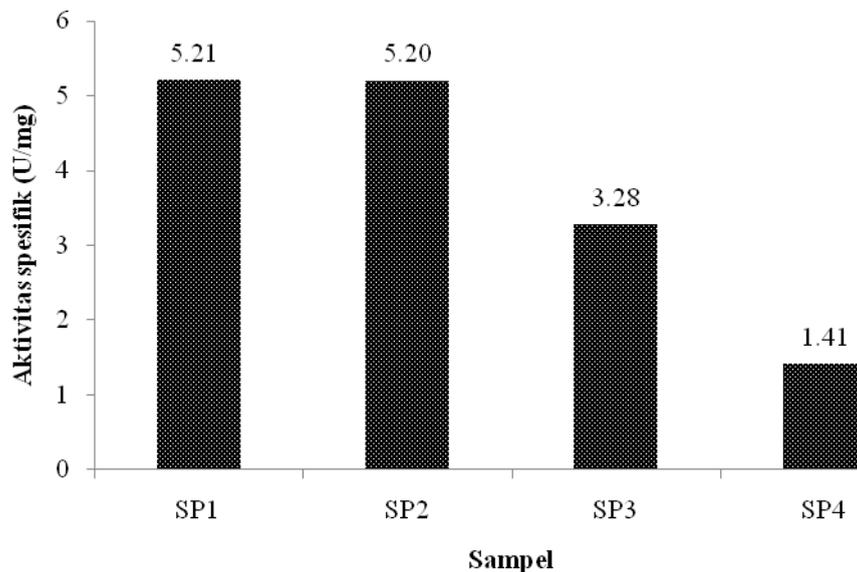
3.1. Ekstraksi Enzim

Polyphenoloxidase

Tahapan ekstraksi enzim kasar dilakukan melalui beberapa tahap

optimasi. Tahapan ini merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Simpson *et al.* (1987). Metode tersebut menggunakan perbandingan sampel banding buffer sebesar 1:3. Pada penelitian ini dilakukan beberapa modifikasi perbandingan buffer, yaitu menggunakan perbandingan 1:3 secara bertingkat (SP1), 1:1 (SP2), 1:2 (SP3), 1:3 (SP4).

Hasil penelitian menggambarkan ekstrak dengan perbandingan sampel : buffer sebesar 1:3 yang dilakukan secara bertingkat menghasilkan aktivitas spesifik yang lebih besar dibandingkan dengan yang lain (Gambar 1). Hal ini diduga karena dengan metode bertingkat jumlah protein yang terekstrak lebih banyak dibandingkan yang lain. Diduga pelet hasil ekstraksi tahap pertama masih menyisakan protein dan protein ini yang terekstrak pada tahap ekstraksi berikutnya.

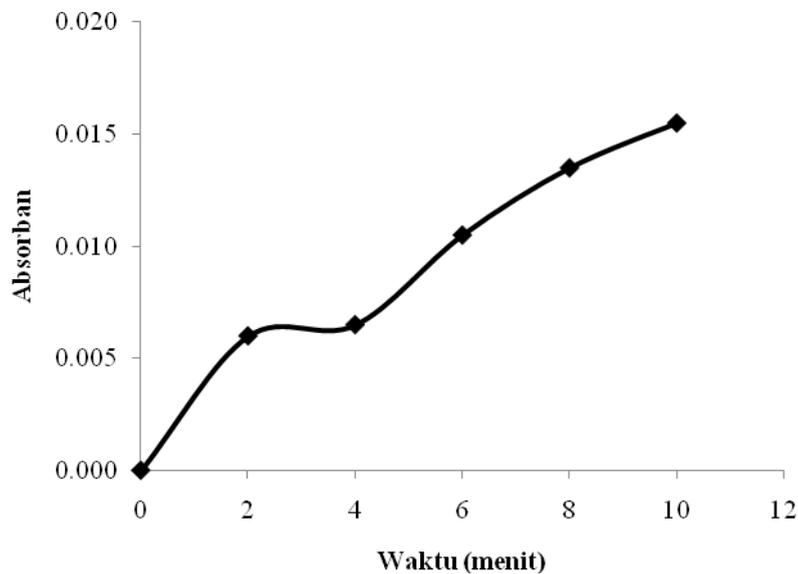


Gambar 1. Aktivitas spesifik dari beberapa ekstrak enzim *polyphenoloxidase* menggunakan perbandingan buffer yang berbeda

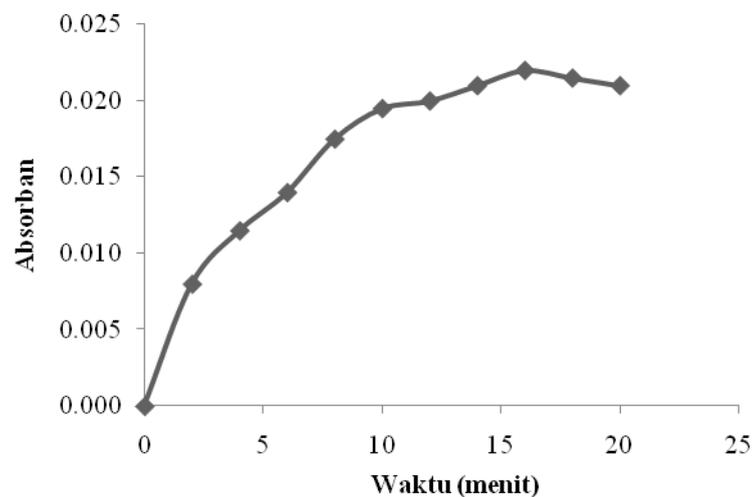
Ekstrak enzim *polyphenoloxidase* SP1 selanjutnya diuji untuk mengetahui aktivitas spesifik dari masing-masing ekstrak. Ekstraksi bertingkat pada sampel SP1 dilakukan sebanyak 3 kali ekstraksi. Hasil uji ini memperlihatkan bahwa dari masing-masing tahap ekstraksi aktivitas spesifik yang diperlihatkan masih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstraksi tahap pertama belum terekstrak seluruh protein dalam hal ini enzim pada sampel. Sehingga pada ekstraksi tahap kedua dan ketiga masih ditemukan aktivitas enzim.

3.2. Optimasi Assay

Optimasi assay dilakukan untuk mengetahui waktu konversi substrat L-DOPA menjadi produk. Pada tahap ini juga diberikan perbandingan suhu inkubasi antara suhu 30 dan 35 °C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi nilai absorbansi akan semakin besar. Namun rasio perubahan absorbansi dengan waktu (dA/dt) semakin lama semakin menurun, yang berarti bahwa jumlah substrat yang bisa dikonversi menjadi produk semakin kecil.



Gambar 2. Peningkatan absorbansi sampel yang diinkubasi pada suhu 30 °C.



Gambar 3. Peningkatan absorbansi sampel yang diinkubasi pada suhu 35 °C.

Suhu inkubasi berpengaruh terhadap peningkatan absorbansi sampel. Suhu 35 °C memberikan laju peningkatan yang lebih besar dibandingkan suhu 30 °C. Laju peningkatan absorbansi di dua menit pertama untuk suhu 35 °C adalah 0,004 sedangkan pada suhu 30 °C sebesar 0,003. Suhu yang lebih tinggi akan meningkatkan gerakan rotasi, vibrasi, translasi ataupun bentuk gerakan lain, sehingga terjadi transfer elektron (Suhartono, 1989). Hal ini yang menyebabkan inkubasi menggunakan suhu 35 °C memberikan laju perubahan substrat yang lebih besar. Montero *et al.* (2001) menyebutkan *polyphenoloxidase* menunjukkan aktivitas tertinggi antara 40 dan 60 °C, tetapi stabil pada suhu 35 °C.

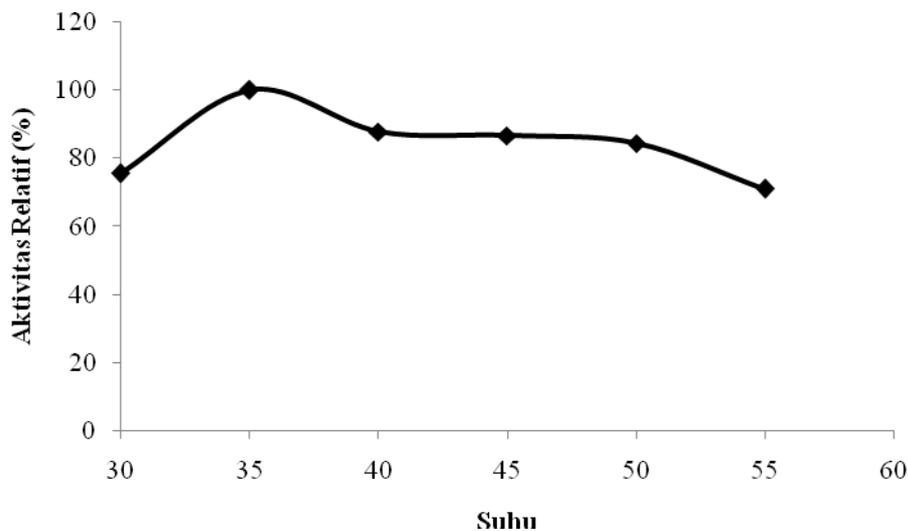
Semakin lama waktu inkubasi laju peningkatan absorbansi akan semakin kecil. Hal ini terjadi karena laju perubahan substrat akan menurun seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Kecepatan pembentukan kompleks enzim substrat sama dengan kecepatan penguraiannya. Kecepatan ini sama dengan kecepatan maksimum reaksi enzim yang dicapai pada konsentrasi substrat tertentu (Suhartono, 1989). Ketika jumlah substrat mengalami penurunan selama waktu

inkubasi, maka jumlah produk yang dihasilkan juga akan semakin menurun.

3.3. Penentuan Suhu Optimum

Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan suatu fenomena yang kompleks. Bertambahnya suhu sampai dengan suhu tertentu akan menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim serta substrat, sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi. Suhu yang lebih besar dari suhu maksimum akan menyebabkan protein enzim mengalami perubahan konformasi yang bersifat detrimental. Substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989).

Suhu inkubasi berpengaruh pada enzim *polyphenoloxidase*. Peningkatan aktivitas enzim terlihat ketika suhu dinaikkan menjadi 35 °C. Penurunan aktivitas terlihat ketika enzim diinkubasi di atas suhu 35 °C (Gambar 4). Hal senada juga disebutkan oleh Benjakul *et al.* (2005) yang menyebutkan *phenoloxidase* (PO) dari *cephalothorax kuruma prawn* memiliki aktivitas maksimum pada suhu 35 °C.



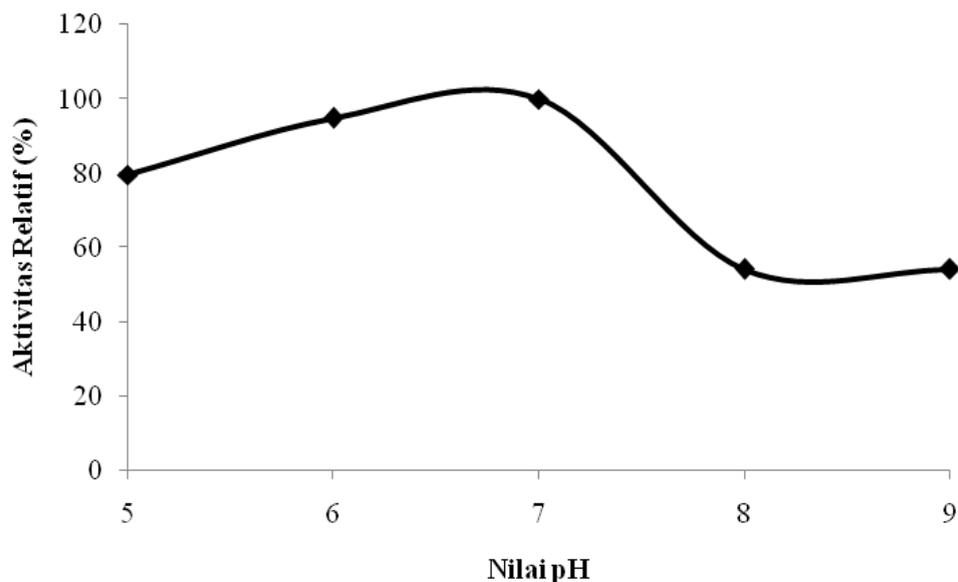
Gambar 4. Suhu optimum aktivitas enzim *polyphenoloxidase*.

Penelitian lain menyebutkan suhu optimum beberapa enzim PPO dari sumber yang berbeda. Gimenez *et al.* (2010) menyatakan aktivitas *polyphenoloxidase* yang ditemukan pada karapas dan ekstrak jeroan *Norway lobster* meningkat sebanding dengan peningkatan suhu hingga 60 °C. Ekstrak karapas menunjukkan kestabilan pada suhu 45 °C. Zamorano *et al.* (2009) melaporkan tidak ada kisaran maksimum yang jelas pada suhu 15-60 °C tetapi stabilitas yang tinggi dicapai pada suhu 30-35 °C. Cong *et al.* (2005) menyatakan *phenoloxidase* dari hemolymph *Ruditapes philippinarum* memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 40 °C. Fan *et al.* (2011) menyatakan PO *Artemia sinica* optimal pada suhu 50 °C. Penelitian yang dilakukan oleh Manheem *et al.* (2012) menunjukkan bahwa kehilangan aktivitas PPO tertinggi ditemukan ketika enzim dipanaskan pada suhu 80 °C dan 90 °C. Ketika suhu yang digunakan berkisar antara 50-70 °C penurunan aktivitas yang terjadi tidak berbeda nyata. Namun peningkatan aktivitas terjadi ketika enzim dipanaskan pada suhu 40 °C.

3.4. Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan menggunakan variasi pH buffer yang berbeda (Gambar 5). Buffer merupakan salah satu komponen penting pada reaksi enzimatik karena kemampuannya untuk menjaga pH. pH buffer yang digunakan bervariasi mulai dari pH 5-9. Pengujian aktivitas enzim pada rentang pH tersebut menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim *polyphenoloxidase* berada pada nilai pH 7. Ketika pH dinaikkan dari 5-7 aktivitas enzim mengalami peningkatan, namun ketika pH dinaikkan lagi diatas 7 aktivitas enzim mengalami penurunan. Benjakul *et al.* (2005) menyebutkan *phenoloxidase* (PO) dari *cephalothorax kuruma prawn* memiliki aktivitas maksimum pada pH 6,5. dan stabil pada kisaran pH 3-10.

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Oleh karena itu pada setiap percobaan dengan enzim diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi. Percobaan yang menggunakan enzim murni hasil isolasi, biasanya dipergunakan buffer buatan atau buffer artifisial misalnya buffer fosfat, asetat, buffer tris dan HEPES.



Gambar 5. pH optimum aktivitas enzim polyphenoloxidase.

Pada umumnya enzim aktif pada pH netral, yaitu pada pH cairan makhluk hidup. Akan tetapi kisaran keaktifan enzim dapat mencapai pH 5-9 (Suhartono, 1989).

Montero *et al.* (2001) *polyphenoloxidase* menunjukkan aktivitas spesifik yang berbeda pada beberapa lokasi di tubuh *tiger prawn* serta aktif pada pH 5 dan 8. Zamorano *et al.* (2009) melaporkan karakterisasi dan distribusi jaringan *polyphenoloxidase* (PPO) pada *deepwater pink shrimp* (*Parapenaeus longirostris*) setelah mati. Enzim memiliki aktivitas tertinggi pada pH 4,5 serta stabil pada pH 4,5 dan 9,0. Cong *et al.* (2005) menyatakan *phenoloxidase* dari hemolymph *Ruditapes philippinarum* optimum pada pH 7. Fan *et al.* (2011) menyatakan PO *Artemia sinica* optimal pada pH 7.

3.5 Kinetika Enzim *Polyphenoloxidase*

Aktivitas enzim PPO diuji menggunakan konsentrasi substrat (L-DOPA) yang berbeda mulai dari 2,5 mM sampai dengan 12,5 mM. Aktivitas ditunjukkan dalam satuan aktivitas relatif (%). Konsentrasi substrat yang memberikan aktivitas enzim optimum adalah sebesar 7,5 mM. Konsentrasi enzim dibawah 7,5 mM menunjukkan aktivitas enzim yang terus meningkat, namun ketika konsentrasi substrat dinaikkan diatas konsentrasi 7,5 mM aktivitas enzim mengalami penurunan (Gambar 6).

Pembentukan kompleks enzim substrat membatasi kecepatan reaksi enzimatik. Kecepatan maksimum reaksi enzim dicapai pada tingkat konsentrasi substrat yang sudah mampu mengubah seluruh enzim menjadi kompleks enzim substrat pada keadaan lingkungan yang memungkinkan. Konsentrasi substrat dibawah konsentrasi ini, reaksi enzim tergantung pada konsentrasi substrat yang ditambahkan, sedangkan pada konsentrasi

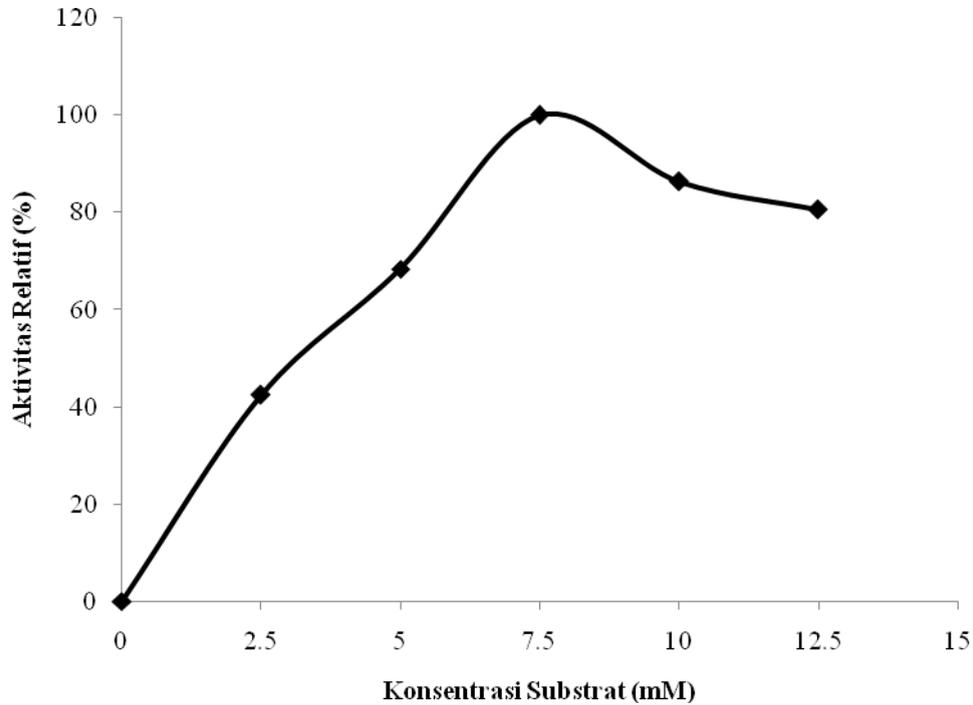
substrat diatas konsentrasi tersebut kecepatan reaksi menjadi tidak tergantung pada konsentrasi substrat (Suhartono, 1989).

Substrat yang digunakan untuk pengujian kinetika enzim adalah L-DOPA dengan berbagai konsentrasi. L-DOPA memiliki kemampuan berikatan yang lebih baik dibandingkan dengan substrat lain. Cong *et al.* (2005) menyebutkan bahwa afinitas L-DOPA dengan enzim lebih tinggi dibandingkan dengan substrat lain, yaitu tirosin. Hal ini dibuktikan dari nilai K_m untuk substrat L-DOPA lebih kecil dibandingkan dengan tirosin.

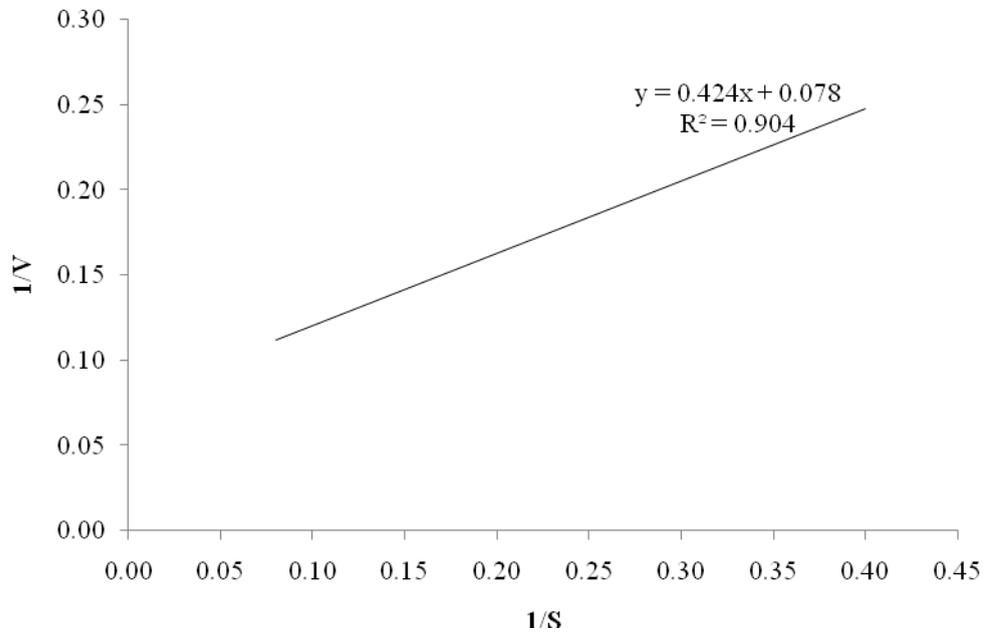
Polyphenoloxidase (1,2-benzene-diol : Oxygen Oxidoreductase; EC. 1.10.3.1) merupakan enzim yang mengandung Cu, yang juga dikenal dengan *catechol oxidase*, *catecholase*, *diphenol oxidase*, *o-diphenolase*, *phenolase*, dan *tyrosinase* (Martinez dan Whitaker, 1995). *Polyphenoloxidase* bertanggung jawab untuk mengkatalis terjadinya dua reaksi dasar. Enzim mengkatalis hidrosilasi ke posisi O yang berdekatan dengan hidrosil yang lain menggunakan substrat berupa fenol dan O_2 . Reaksi kedua adalah oksidasi dari diphenol menjadi *o-benzoquinon*, yang selanjutnya teroksidasi menjadi melanin (produk berwarna coklat) biasanya melalui mekanisme non enzimatik (Kim *et al.*, 2000).

Kinetika enzim berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk menunjukan bahwa K_m enzim PPO dari *Panaeus monodon* sebesar 5,42 mM (Gambar 7). Nilai K_m ini masih lebih rendah dibandingkan dengan beberapa penelitian lain, seperti enzim pada *Ruditapes philippinarum* sebesar 2,2 mmol/L (Cong *et al.*, 2005), *Charybdis japonica* sebesar 2,90 mM (Fan *et al.*, 2009), *Panaeus vannamei* sebesar 1,47 mM (Garcia-Carreno *et al.*, 2008), *Parapenaeus longirostris* sebesar 1,85 mM (Zamorano *et al.*, 2009). Nilai K_m yang rendah ini

disebabkan karena ekstrak enzim PPO masih kasar sehingga diduga pengotor di dalamnya masih banyak. Metode pemurnian dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim PPO.



Gambar 6. Konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim *polyphenoloxidase*.



Gambar 7. Kinetika enzim *polyphenoloxidase*.

3.6 . Pengaruh Ion Logam terhadap Enzim

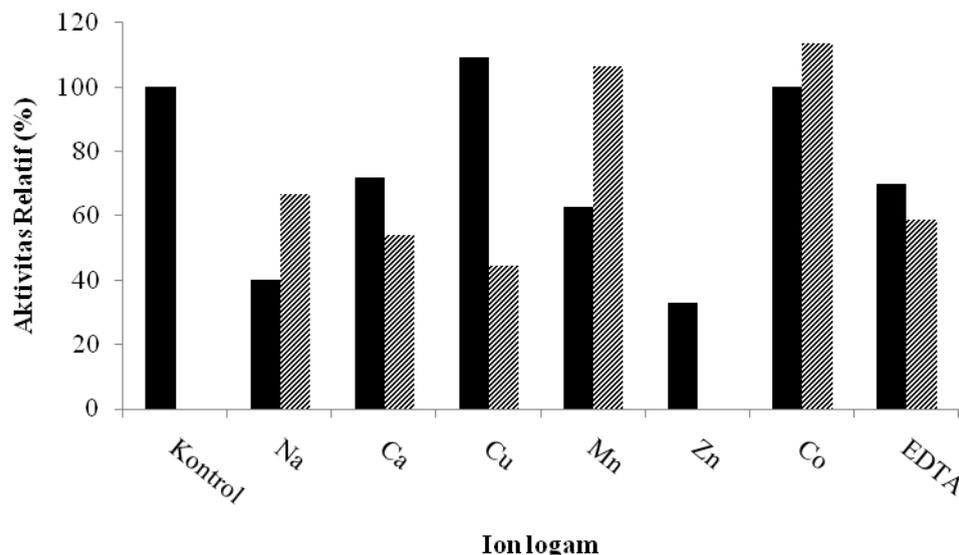
Ion logam mempengaruhi aktivitas enzim *polyphenoloxidase* (PPO). Ion logam dapat meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim setelah berinteraksi dengan enzim. Ion logam yang meningkatkan aktivitas enzim disebut dengan aktivator sedangkan yang menurunkan aktivitas enzim disebut dengan inhibitor. Ion logam yang mempengaruhi kerja aktivitas enzim PPO dapat dilihat pada Gambar 8.

Kontrol menunjukkan aktivitas PPO yang tidak ditambahkan ion logam, ditunjukkan dengan aktivitas relatif 100%. Gambar menunjukkan bahwa Na^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , dan EDTA dengan konsentrasi 10 mM menurunkan aktivitas enzim PPO. Demikian halnya dengan Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , dan EDTA dengan konsentrasi 5 mM. Namun Cu dengan konsentrasi 5 mM, Mn^{2+} dengan konsentrasi 10 mM, dan Co dengan konsentrasi 5 dan 10 mM meningkatkan aktivitas enzim PPO.

Penelitian yang dilakukan oleh Cong *et al.* (2005) menyebutkan bahwa

logam Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} menghambat aktivitas kerja enzim PO. Zn^{2+} menghambat aktivitas PO *Ruditapes* tertinggi pada konsentrasi 1 mM. Demikian halnya dengan EDTA menghambat aktivitas PPO sebesar 100% pada konsentrasi 10 mM. Penelitian yang dilakukan oleh Fan *et al.*, (2009) menyatakan bahwa Cu, Zn, Ca, Mg, dan EDTA juga menghambat enzim PPO. EDTA dengan konsentrasi 10 mM menghambat enzim sampai 100%. Hasil tersebut menyatakan bahwa PPO merupakan jenis metaloenzim.

Selain beberapa ion logam, enzim PPO juga bisa dihambat oleh beberapa inhibitor protease. Protease sendiri bisa dihambat oleh beberapa ion logam. Ferrer *et al.* (1989) menyatakan ekstrak PO kasar umumnya memiliki aktivitas yang rendah. Semua protease inhibitor mencegah aktivasi *phenoloxidase*. Benjakul *et al.* (2006) menyatakan sistein dan glutathione menunjukkan aktivitas penghambatan pada PO *kuruma prawn*.



Gambar 8. Pengaruh beberapa logam terhadap enzim *polyphenoloxidase* ■ konsentrasi logam 5 mM ▨ konsentrasi logam 10 mM

IV. KESIMPULAN

Metode terbaik untuk mengekstraksi enzim adalah menggunakan perbandingan buffer 1:3 secara bertingkat. Suhu untuk pengujian enzim adalah 35 °C. pH optimum kerja enzim PPO adalah 7 dengan suhu optimum 35 °C. Konsentrasi L-DOPA yang digunakan untuk memperoleh aktivitas optimum enzim adalah 7,5 mM. Penghitungan kinetika enzim menunjukkan bahwa nilai Km enzim PPO sebesar 5,42 mM. Beberapa ion logam digunakan untuk melihat pengaruh enzim terhadap ion logam. Na⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, dan EDTA dengan konsentrasi 10 mM menghambat aktivitas enzim PPO. Selain itu Na⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, dan EDTA dengan konsentrasi 5 mM juga menghambat kerja enzim PPO.

DAFTAR PUSTAKA

- Benjakul, S., W. Visessanguan, and M. Tanaka. 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the Cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *J. of Food Biochem.*, 29:470–485
- Benjakul, S. W. Visessanguan, and M. Tanaka. 2006. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chem.*, 98:158–163.
- Bono, G., C. Badalucco, A. Corrao, S. Cusumano, L. Mammì, and G.B. Palmegiano. 2010. Effect of temporal variation, gender and size on cuticle polyphenol oxidase activity in deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chem.*, 123:489–493.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:234-254.
- Cong, R., W. Sun, G. Liu, T. Fan, X. Meng, L. Yang, and Zhu. 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *J. FSI.*, 18:61-70.
- Fan, T., Y. Zhang, L. Yang, X. Yang, G. Jiang, M. Yu, and R. Cong. 2009. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *J. CBPB.*, 152:144–149.
- Fan, T., J. Zhao, X. Fan, M. Yu, and G. Jiang. 2011. Purification and characterization of phenoloxidase from brine shrimp *Artemia sinica*. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 43: 722–728
- Ferrer, O.J, J.A. Koburger, W.S. Otwell, R.A. Gleeson, B.K. Simpson, and M.R. Marshall. 1989. Phenoloxidase from the cuticle of florida spiny lobster (*Panulirus argus*): mode of activation and characterization. *J. of Food Science*, 54(1):63-67
- Garcia-Carreno, F.L., K. Cota, and M.A.N.D. Toro. 2008. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in *Postmortem melanosis*. *J. Agric. Food Chem.*, 56:6454–6459.
- Kim, J., M.R. Marshall, and C. Wei. 2000. Polyphenoloxidase. *Dalam*: Haard N.F. and B.K. Simpson (eds.). *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. New York: Marcel Dekker, Inc. hlm.:271-316.

- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2011. Statistik ekspor hasil perikanan. Pusat Data, Statistik, dan Informasi, Sekretariat Jenderal, Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Manheem, K., S. Benjakul, K. Kijroongrojana, and W. Visessanguan. 2012. The effect of heating conditions on *polyphenol oxidase*, proteases and melanosis in pre-cooked Pacific white shrimp during refrigerated storage. *Food Chem.*, 131:1370–1375
- Martinez, M.V. and J.R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6:195-200.
- Montero, P, A. Avalos, and M. Perez-Mateos. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem.*, 75:317–324.
- Simpson B.K., M.R. Marshall, and W.S. Otwell. 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, 35:918-921
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan bioteknologi. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Zamorano, J.P., O. Martinez-Alvarez, P. Montero, and M.C.Gomez-Guillén. 2009. Characterisation and tissue distribution of *polyphenol oxidase* of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry*, 112:104–111.

Diterima :7 Oktober 2013

Direvisi :8 Desember 2013

Disetujui :17 Desember 2013