

Analisis Aktivitas Enzim Antioksidan Katalase dan Peroksida

Fitri^{1*} dan Hasria Alang²

¹Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya,
Jalan Veteran Malang

² Program Studi Pendidikan Biologi, STKIP Pembangunan Indonesia, Jln. Inspeksi Kanal Citra Land No. 10 Makassar

Email: fitriyusuf38@gmail.com

Abstrak

Enzim atau biokatalisator adalah katalisator organik yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan, karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Praktikum ini bertujuan mengamati tingkat aktivitas enzim katalase dan peroksidase pada daun selama cekaman kekeringan, salinitas dan kontrol. Analisis aktivitas enzim katalase dengan cara supernatan sebanyak 0,04 ml ditambahkan kedalam larutan yang mengandung 2,56 ml, 50 Mm Pottasium Phosphate Buffer pH 7 dan 0,4 ml 15 Mm H₂O₂ dalam waktu satu menit menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 240 nm. Kurva standar katalase diperoleh persamaan $Y = 2,045.x - 0,173$; $R^2 = 0,976$ yang digunakan dalam perhitungan aktivitas enzim katalase... Aktivitas enzim katalase tertinggi terjadi pada tanaman kontrol dengan aktivitas enzim katalase sebesar 13.189 $\mu\text{mol/g}$ dan pada tanaman yang diberi perlakuan salinitas sebesar 13.158 $\mu\text{mol/g}$ aktivitas enzim paling rendah terjadi pada tanaman dengan perlakuan kekeringan 12.670 $\mu\text{mol/g}$.

Kata Kunci: *Aktivitas Enzim, Katalase, Kekeringan, Salinitas*

Latar Belakang

Enzim atau biokatalisator adalah katalisator organik yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan, karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Jika tidak ada enzim, atau aktivitas enzim terganggu maka reaksi metabolisme sel akan terhambat hingga pertumbuhan sel juga terganggu. Sehubungan dengan potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), dan katalase yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel [1][2].

Reaktif Oxygen Spesies (ROS) merupakan radikal bebas yang sangat berbahaya bagi makhluk hidup. Pada tanaman ROS terbentuk dalam sel melalui beberapa cara yaitu. Produksi fitokimia di atmosfer akibat pencemaran udara, penyumbatan elektron langsung ke oksigen ketika terjadi fotosintesis terutama pada kondisi cahaya yang tinggi dan konsentrasi CO₂ pada kloroplas yang rendah, respon terhadap kondisi

cekaman seperti kekeringan, suhu tinggi, salinitas ozon dan serangan mikroba [3].

Tiap varietas tanaman mungkin memiliki reaksi yang sangat kompleks menghadapi cekaman kekeringan yang ditunjukkan oleh bentuk metabolisme tanaman yang berbeda. Oleh karena itu perlu dipelajari berbagai mekanisme yang dilakukan tanaman agar tetap tumbuh dan bereproduksi dengan baik walau dalam kondisi cekaman kekeringan. Berdasarkan masalah ini maka dilakukan penelitian mengenai enzim antioksidan berupa katalase dan peroksidase yang terdapat pada tanaman tomat yang diberi perlakuan. ROS yang terbentuk akan berbahaya bagi sel tanaman karena ia dapat menoksidasi membran lipid dan aparatus fotosintesis. Melalui berbagai reaksi metabolisme tanaman oksigen dapat diubah menjadi bentuk molekul yang sangat reaktif seperti singlet oksigen (O₂), hidrogen peroksida (H₂O₂), superoksida (O₂) dan radikal hidroksil (OH). Superoksida dapat berubah bentuk menjadi hidrogen peroksida (H₂O₂), radikal ini dapat menyebabkan kerusakan melalui beberapa cara yaitu memutus ikatan rantai protein, merusak membran lemak dan bereaksi dengan DNA sehingga menyebabkan mutasi sel. Anion superoksida juga dapat terbentuk di dalam tanaman dari proses

autoooksidasi dengan adanya oksigen, transport elektron didalam fotosintesis dan bereaksi dengan NADPH dalam membran glioksisom dan peroksisomal, yang dapat merusak jaringan tanaman [4].

Praktikum ini bertujuan mengamati tingkat aktivitas enzim katalase dan periksodase pada daun selama cekaman kekeringan, salinitas dan kontrol.

Metode Penelitian

Metode yang dilakukan dalam praktikum ini yang pertama dilakukan yaitu Ekstraksi enzim dengan menggunakan daun tomat yang dibberi perlakuan (kontrol, salinitas dan kekeringan) sebanyak 0,2 g sampel ditambah 1 ml buffer PO₄ 0,1 M pH 6,8 yang mengandung 0,1 mM EDTA dan 20 mg PVP digerus dengan mortar dan pestel hingga homogen . homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4 °C

Hasil dan Pembahasan

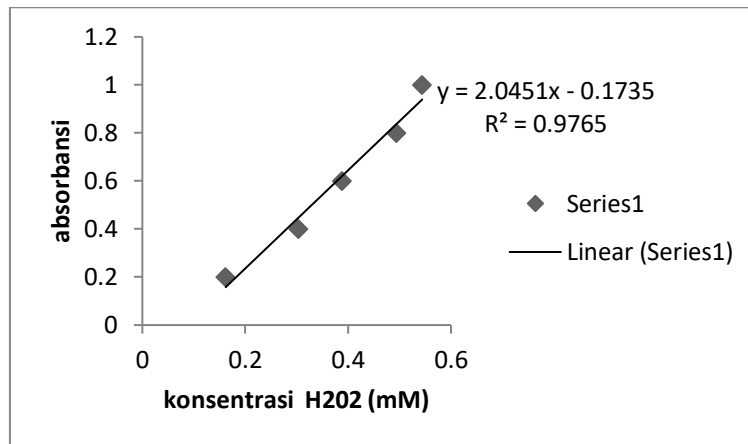
Enzim antioksidan tanaman juga dapat meningkatkan mekanisme untuk menghadapi kekiringan dan cekaman oksidatif dengan mengakumulasi senyawa osmoprotektan dan larutan yang sesuai. Sudah sangat umum ditemukan pada tanaman yang mengalami cekaman osmotik seperti kekeringan, salinitas serta suhu tinggi dan suhu rendah, sebagai upaya tanaman untuk melindungi enzim dari proses denaturasi [5]. Seperti halnya katalisator, enzim dapat mempercepat reaksi Kimia dengan menurunkan energi aktivasinya. Enzim tersebut akan bergabung sementara dengan reaktan sehingga mencapai keadaan transisi dengan energi aktivasi yang lebih rendah daripada energi aktivasi yang

selama 20 menit . supernatan yang diperoleh digunakan untuk menguji aktivitas enzim katalase dan peroksidase. Selanjutnya dilakukan analisis aktivitas enzim.

Analisis aktivitas enzim katalase dengan cara supernatan sebanyak 0,04 ml ditambahkan kedalam larutan yang mengandung 2,56 ml, 50 Mm Pottasium Phosphate Buffer pH 7 dan 0,4 ml 15 Mm H₂O₂ dalam waktu satu menit menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 240 nm.

Analisis aktivitas enzim peroksidase supernatan diambil sebanyak 0,3 ml ditambahkan kedalam larutan berisi 2,1 ml buffer PO₄ 0,1 M pH 6,8,; 0,3 ml guaiacol 1,6 % dan 0,3 ml H₂O₂ 0.04 M. Aktivitas dari peroksidase ditentukan dengan mengukur habisnya H₂O₂ dalam waktu satu menit menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 470 nm.

diperlukan untuk mencapai keadaan transisi tanpa bantuan katalisator atau enzim. Kurva standar katalase dibuat dan dicari nilai R² – nya. Nilai R² atau kofisien determinasi merupakan angka yang nilainya berkisar dari 0 sampai 1 yang menunjukkan seberapa dekat nilai perkiraan untuk analisis regresi yang mewakili data sebenarnya. Analisis regresi paling dapat dipercaya jika nilai R² sama dengan atau mendekati 1[6]. Dari hasil kurva standar katalase diperoleh persamaan Y= 2,045.x – 0,173; R² = 0,976 (gambar.1) yang digunakan dalam perhitungan aktivitas enzim katalase. Aktivitas katalase ditentukan dengan mengukur habisnya H₂O₂ dalam waktu satu menit menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 240 nm.

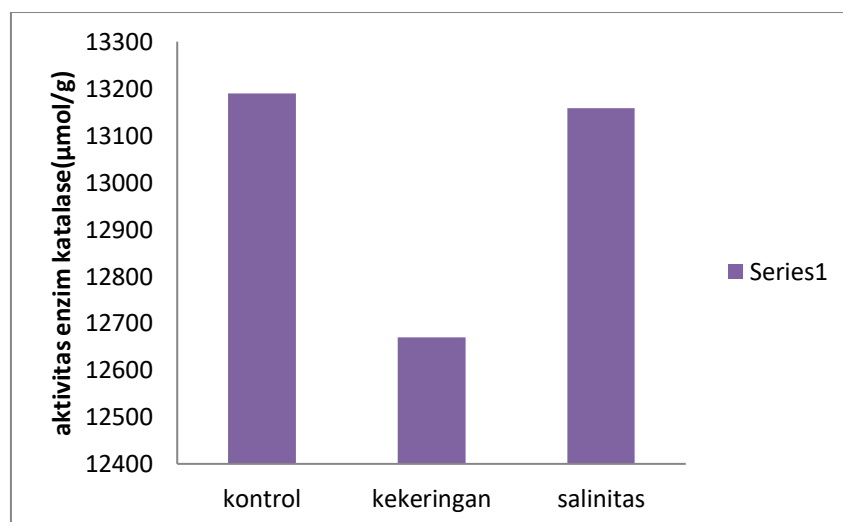


Gambar 1. Kurva Standar Katalase

Penentuan aktivitas enzim katalase dalam setiap sampel, diukur dengan pengukuran absorbansi sampel dengan pembuatan kurva standar aktivitas enzim katalase (gambar 1). Serapan sampel diukur dengan panjang gelombang 240 nm. Kemudian aktivitas katalase dihitung dengan menggunakan rumus yang didapatkan dari kurva standar katalase dan perhitungan jumlah aktivitas katalase selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase pada sampel ($\mu\text{mol/g}$) (gambar 2).

Enzim katalase akan mengkatalis dekomposisi salah satu ROS yakni hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen

sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif [7]. Reaksi pertama menjelaskan bahwa satu molekul hidrogen peroksida (H_2O_2) mengoksidasi heme yang terdapat dalam katalase yang berada dalam bentuk *resting-state* (Enz (Por-FeIII)) menjadi bentuk *oxyferryl*. Satu oksidasi setara dengan penghilangan besi (Fe) dan satu dari cincin porfirin (Por) sehingga menghasilkan senyawa I (Cpd I) yaitu kation porfirin radikal ($\text{Por}^+-\text{FeIV}=\text{O}$). Selanjutnya molekul hidrogen peroksida dalam reaksi kedua digunakan sebagai reduktor senyawa I untuk regenerasi enzim *resting-state* (Enz(Por-FeIII)), air (H_2O) dan oksigen(O_2)[8].



Gambar 2. Aktivitas Enzim Katalase Pada Daun Tomat

Aktivitas enzim katalase tertinggi terjadi pada tanaman kontrol dengan aktivitas enzim katalase sebesar $13.189 \mu\text{mol/g}$ dan pada tanaman yang diberi

perlakuan salinitas sebesar 13.158 $\mu\text{mol/g}$ aktivitas enzim paling rendah terjadi pada tanaman dengan perlakuan kekeringan sebesar 12.670 $\mu\text{mol/g}$ (*gambar.2*). Hal ini terjadi karena sebagai salah satu enzim antioksidan, aktivitas katalase akan meningkat ketika stress oksidatif terjadi, pada praktikum ini stress oksidatif yang diberikan yaitu dengan pemberian cekaman kekeringan tanaman dibiarkan tanpa penyiraman dan perlakuan salinitas disiram dengan penambahan NaCl 5000 ppm. Tanaman tomat diberi beberapa perlakuan agar tomat mengeluarkan enzim antioksidan. Enzim-enzim antioksidan intrasel dapat mengalami penurunan aktivitas akibat kondisi stres oksidatif [9]. Penelitian yang dilakukan oleh Zainuri 2012, menyatakan bahwa stres oksidatif yang diakibatkan hipoksia dapat menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim katalase [10]. Katalase adalah enzim yang mengandung heme yang mengkatalis dismutasi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Enzim ini ditemukan pada semua jenis eukariot aerob, yang penting untuk memusnahkan H_2O_2 yang terbentuk dalam peroksisom melalui reaksi oksidasi, seperti oksidasi asam-asam lemak, siklus glikosilat (dalam fotosintesis), dan katabolisme purin [11].

Untuk mengatasi terjadinya cekaman oksidatif, tanaman memiliki mekanisme untuk meningkatkan ketahanannya diantaranya dengan meningkatkan ketahanannya diantaranya dengan meningkatkan pembentukan dan aktivitas beberapa enzim antioksidan dan senyawa lainnya yang dapat menyelamatkan tanaman [12]. Kerusakan cekaman oksidatif terjadi apabila terjadi ketidakseimbangan antara kemampuan enzim antioksidan dan toksifikasi [13].

Perlakuan cekaman kekeringan diduga akan sangat berpengaruh bila tanaman masih dalam tahap pertumbuhan vegetatif, seperti hasil penelitian Kecel dan Oncel (2002) pada tanaman gandum dimana cekaman kekeringan dan salinitas akan sangat berpengaruh terhadap

terhambatnya pemanjangan pucuk (tinggi tanaman).

Kesimpulan

Aktivitas enzim katalase tertinggi terjadi pada tanaman kontrol dengan aktivitas enzim katalase sebesar 13.189 $\mu\text{mol/g}$ dan pada tanaman yang diberi perlakuan salinitas sebesar 13.158 $\mu\text{mol/g}$ aktivitas enzim paling rendah terjadi pada tanaman dengan perlakuan kekeringan 12.670 $\mu\text{mol/g}$.

Daftar Pustaka

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin. MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Anatriera, R.A. (2009). Aktivitas 1. spesifik katalase jaringan ginjal tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Pritchard SG, Ju Z, Santen EV, Qiu J, Weaver DB, Prior SA, Roger H. 2000. The influence of elevated CO_2 on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Aust J Plant Physiol* 27: 1061-1068.
- Untari, E.K. Sri. W., Agustia, D. 2014. Efek Fraksi *n*-heksana Kulit *Hylocereus polyrhizus* Terhadap Aktivitas Katalase Tikus Stres Oksidatif. *Original Article*. Vol.1 No. 1.
- Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D. 2002. Freezing Tolerant Tobacco, Transformed To Accumulate Osmoprotectant. *Plant Science* 163: 157-164.
- Ayu. R. Anatriera. 2009. Aktivitas Spesifik Katalase jaringan ginjal tikus yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. *Skripsi*. FK. UI. Hal. 50.
- Mirsa, D. S., Maiti, R., Gosh, D. (2009). Protection of Swimming- Induced

- Oxidative stress in some vital organs by the treatment of composite extract of *Withania somnifera*, *Ocimum Sanctum* and *Zingiber Officialis* in Male rat. *African Journal Tradisional*, 6 (4), 534-543.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004). 5. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208.
- Suarsana, W.T., Suprayogi, A. 2013. Respon Stres Oksidatif dan Pemberian Isoflavon terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus. *JITV*, 18(2), 146-152.
- Zainuri, Masagus., Septelia, I.W. (2012). 38. Aktivitas spesifik Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik: hubungannya dengan kerusakan oksidatif. *Media Litbang Kesehatan*, 22(2), 87-92.
- Winarsi H. 2007. Antioksidan alami dan radikal bebas. Jogjakarta: Penerbit Kanisius.
- Rhodes D. Samaras Y. 1994. Genetic control of osmoregulation in plants, in: Strange K. (Ed), *Cellular and Molecular Physiology of cell volume regulation*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 347-361.
- Rodriguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL. 2002. Reaktive Oxygen Spesies in the Elongation Zone of Maize Leaves Are Necessary for Leaf Extension. *Plant physiol*, 129: 1627-1632.