

## ETILEN LUKA, AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE, POLIFENOL OKSIDASE, DAN FENIL ALANIN LIASE PADA IRISAN MESOKARP LABU KUNING

*Wound Ethylene, Activity of Peroxidase, Polyphenol Oxidase, and Phenyl Alanine Amonia Lyase Enzymes in Wounded Winter Squash Fruit Mesocarp Tissue*

Murdijati Gardjito<sup>1)</sup> Mochamad Adnan<sup>1)</sup> Tranggono<sup>1)</sup>

### ABSTRACT

*Winter squash fruit is a non-climateric fruit which produced very low ethylene as intact fruit but peeled or sliced mesocarp produced a considerably high wound-ethylene. In certain level of concentration, ethylene could induce various reaction in the wound tissue. This study has objectives of obtaining informations on the influence of wound ethylene on the activities of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), and phenyl alanine ammonia lyase (PAL) which catalyze some physiological process related with the changes in colour, flavour, and taste in the wound fruit tissue or its products.*

*Experiments in this study were conducted in continous phase of 44 hours using flowthrough system at 25 °C. Analysis and measuremets were done for ethylene, POD, PPO, and PAL enzymes at certain time interval. The sample used were disks of 9 mm in deiameter and 2 mm thickness and cylinders of 14 mm in deiameter and 2 cm in heihgt.*

*The Results of this study indicated that the presence of wound combined with the certain level of wound ethylene formation induced the POD enzyme activity. The PPO activity increased proportionally with the increased surface area ratio to the fresh weight of wounded tissue. PAL activity was only evident 3 hours after wounding. The PAL activity increased following the same pattern of wound ethylene formation. The larger the woundsurface area ratio to the fresh weight of the tissue, the more ethylene were produced, and the higher the activities of those enzymes. Various pretreatments could effectively suppress the formation of wound ethylene and lowered activities of those enzymes.*

**Keywords :** *wound ethylene, peroxidase, polyphenol oxidase, phenyl alanine ammonia lyase, winter squash fruit*

### PENDAHULUAN

Jaringan mesokarp labu kuning yang terluka (karena terpotong atau teriris) dapat memproduksi etilen cukup tinggi, yang dikenal dengan *wound ethylene* (etilen luka) (Hyodo, 1977; Hyodo *et al.*, 1983). Etilen luka ini, pada jaringan tanaman lain, dapat menginduksi atau memicu aktivitas beberapa enzim. Rasa sepet atau pahit dapat disebabkan oleh terbentuknya senyawa tertentu dalam metabolisme fenolat yang dapat dipicu oleh etilen luka.

Pada jaringan luka khususnya pada buah-buahan, meningkatnya produksi etilen luka diikuti oleh proses respirasi yang juga meningkat dan disebut *wound respiration*. Dalam hal ini etilen luka dapat memicu berbagai proses metabolisme ikutan, seperti peningkatan aktivitas enzim peroksidase (POD) (Grischbach, 1981), polifenol oksidase (PPO) dan fenilalanin

amonia lyase (PAL) (Imaseki *et al.*, 1968; Hyodo & Yang, 1971a dan 1971b). Metabolisme fenolat dapat pula berkaitan dengan pembentukan zat warna selain pembentukan fenil propanoida (Yang & Pratt, 1978). Enzim POD dan PPO berperan dalam mengkatalisasi berbagai proses oksidatif pada reaksi perubahan warna, cita rasa, dan pembentukan senyawa toksin sebagai reaksi atas serangan patogen atau luka pada jaringan tanaman. Enzim PAL memiliki peran dalam proses metabolisme fenolat yang merupakan rangkaian reaksi metabolisme utama dalam jaringan tanaman dengan produk antara lain asam klorogenat.

Dari hasil penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa luas muka luka sangat mempengaruhi produksi etilen luka (Murdijati-Gardjito, 2001). Apakah ini juga mempengaruhi aktivitas enzim-enzim belum diketahui.

<sup>1)</sup> Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281.

Telah diketahui bahwa etilen dapat memicu aktivitas berbagai enzim yang mengkatalisis proses degradasi. Peningkatan aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL mengakibatkan kenaikan asam klorogenat pada ubi jalar setelah pengirisan (Imaseki *et al.*, 1968) dan hal ini terbukti dipicu oleh etilen. Telah ditemukan pula bahwa pada irisan mesokarp labu kuning terdapat peningkatan aktivitas POD, PPO, dan PAL, tetapi belum diketahui kaitannya dengan pembentukan asam klorogenat dan rasio luas permukaan luka terhadap berat jaringannya (Hyodo *et al.*, 1983 dan 1985).

Etilen luka pada irisan mesokarp labu kuning berkaitan dengan kenaikan aktivitas beberapa enzim dan dalam proses pengolahan tepung labu diberikan beberapa macam perlakuan untuk mengurangi aktivitas enzim. Oleh karena itu, diperlukan suatu kajian tentang kaitan perlakuan sebelum pengeringan seperti pencelupan dalam larutan Na-metabisulfit dan atau berbagai cara blansing-terhadap produksi etilen luka, aktivitas enzim-enzim tertentu seperti POD, PPO, PAL, serta kandungan asam klorogenat.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Labu kuning yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah dari tanaman *Cucurbita maxima* Duch, varietas Rizalina. Biji labu kuning diperoleh dari Philippine National Seed Foundation dan dibudidayakan di Balai Benih Induk Hortikultura, Dinas Pertanian Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, Ngipiksari, Pakem, Yogyakarta berturut-turut dari tahun 1991 sampai dengan 1994. Kriteria buah yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : umur buah 50-60 hari setelah penyerbukan; lekuk buah penuh dan keras; tangkai buah membesar, mengering, liat, bergabus, dan berkerut-kerut; serta berat buah 2,0 kg atau lebih. Buah yang dipanen dibersihkan dan disimpan pada suhu 25 °C hingga digunakan. Bentuk buah yang dipanen ada yang bulat, bulat gepeng dengan warna kulit hijau berbintik kuning, kuning, atau kuning kecoklatan.

Bahan-bahan kimia, seperti : 2-Merkapto ethanol, piri-doksal fosfat, reagen Folin Ciocalteu fenol, katekol, kantong dialisis, dan -asam klorogenat dibeli dari Sigma & Co. dan bahan kimia lain dibeli dari pedagang bahan kimia setempat.

### Cara Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua bagian. Pada bagian pertama diteliti kaitan antara etilen luka, aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL, serta kandungan asam klorogenat pada berbagai luas muka mesokarp labu kuning. Pada bagian ini terdiri atas dua tahap berurutan. Tahap pertama menggunakan sampel berbentuk silinder dan tahap kedua menggunakan sampel berbentuk keping. Lama inkubasi setiap tahap adalah 44 jam pada

suhu 25 °C. Sampel ditempatkan di dalam tabung kaca yang dilengkapi dengan pipa yang dihubungkan dengan sistem aliran udara. Produksi etilen, aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL, serta kandungan asam klorogenat atau senyawa fenolat diukur pada 30 menit, 3, 10, 20, 25, 30, dan 44 jam setelah pengirisan. Semua pengukuran diulang tiga hingga lima kali.

Pada bagian kedua diteliti pengaruh beberapa perlakuan terhadap etilen luka, aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL, serta kandungan senyawa fenolat. Sampel berbentuk keping diberi variasi perlakuan antara lain dengan pemanasan (blansing) dengan cara mencelupnya dalam air suhu 95 °C, dengan uap air, dan perendaman perendaman dalam larutan Na-metabisulfit 0,25 % selama 30 menit. Pada blansing dengan pencelupan, sampel yang ditempatkan pada kantong yang terbuat dari jala benang nilon dicelupkan pada air suhu 95 °C selama 5 detik. Selanjutnya dicuci dengan air dingin dan ditiriskan. Pada blansing dengan uap, sampel dalam kantong benang nilon dipanasi dengan uap air mendidih suhu 85-90 °C selama satu menit. Selanjutnya dicuci dengan air dingin dan ditiriskan.

### Penyiapan sampel penelitian

Penarikan sampel buah dilakukan secara acak. Sampel penelitian ada dua macam, yaitu irisan mesokarp labu kuning berbentuk silinder (diameter 14,0 mm dan tebal 2,0 cm) yang menyatakan rasio luas muka dan berat 4,5 cm<sup>2</sup>/g dan keping (diameter 9,0 mm dan tebal 2 mm) dengan rasio luas muka dan berat 15,5 cm<sup>2</sup>/g.

Irisan mesokarp labu berbentuk silinder dibuat dengan mengebor bagian lekuk buah yang menonjol menggunakan pengebor gabus *stainless steel*, diameter 14,0 mm. Hasil pengeboran ini selanjutnya dipotong pada bagian kulit luar dan bagian pengikat bijinya hingga tebalnya kurang lebih 2,0 cm. Buah yang telah diambil mesokarpnya menggunakan pengebor gabus, selanjutnya dibuang.

Irisan mesokarp labu berbentuk keping dibuat dengan cara yang sama untuk irisan silinder, namun dengan diameter 9,0 mm. Dipotong bagian kulit luar dan bagian pengikat bijinya dan selanjutnya dipotong hingga tebalnya 2,0 mm (dengan tangan atau menggunakan *house hold grater*).

Penyiapan sampel dalam semua percobaan ditentukan paling lama 30 menit, agar waktu penyiapan sampel tidak merupakan faktor yang harus diperhitungkan. Semua sampel, baik yang berbentuk silinder maupun keping, pada semua penyiapan percobaan diatur dalam botol, bejana, atau wadah beralaskan kertas saring basah, tidak saling menumpuk atau terlalu banyak. Semua benda yang digunakan dalam penyiapan sampel telah dibersihkan dan direbus dalam air panas, dicelup dalam alkohol encer dan ditiriskan, agar tidak tercemar atau kotor. Sampel dan semua peralatan yang digunakan untuk percobaan disimpan atau ditempatkan dalam ruangan yang bersih dan kering bersuhu 25 °C sesuai suhu percobaan.

## Rangkaian percobaan

Rangkaian percobaan yang digunakan adalah rangkaian alir. Rangkaian alir terdiri atas tiga bagian besar, yaitu sistem aliran udara yang dihubungkan dengan pembagi aliran udara dengan papan alir (*flow board*) yang memiliki pipa bercabang sesuai dengan jumlah tabung sampel. Papan alir ini dilengkapi dengan barostat untuk mengatur tekanan dan manometer air untuk mengukur tekanan. Terdapat pula pipa kapiler (*restrictor*) yang dihubungkan dengan cabang pipa dan berguna untuk membatasi kecepatan aliran udara, biasanya 3 liter/jam.

Bagian yang ketiga dari sistem ini adalah sekumpulan tabung berisi sampel yang dihubungkan dengan pipa aliran udara oleh pipa plastik lentur.

Tabung yang dialasi kertas saring basah dengan sampel yang diatur di dalamnya, ditutup dengan tutup karet yang mempunyai dua pipa kaca. Satu pipa dihubungkan dengan pembagi aliran udara dan yang lain dengan pipa plastik lentur berklemp untuk mengambil sampel gas yang dianalisa.

Untuk keperluan perhitungan, setiap kali pengambilan sampel gas selalu diikuti pengukuran kecepatan aliran udara yang masuk ke dalam tabung sampel menggunakan alat pengukur kecepatan aliran udara berdasarkan perjalanan gelembung sabun dalam pipa (*soap bubble meter*).

## Cara analisa

### Penentuan aktivitas POD (Golan et al., 1977)

Bahan segar sebanyak 5,0 g diiris-iris dan dihancurkan selama 2 menit dalam *super blender* dengan larutan buffer Na-fosfat 0,1 M, pH 6,5 (1:5 w/v) lalu disaring dengan kain atau kertas saring. Selanjutnya, filtrat disentrifus selama 15 menit pada 3000 rpm. Supernatan ditambah 10,0 ml larutan buffer Na-fosfat 0,05 M, pH 6,5, 1 ml larutan guaiakol 0,5 % dalam alkohol 50 %, dan 1 ml larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 %. Campuran ini seterusnya ditera absorbansinya pada 470 nm dengan spektrofotometer dan aktivitasnya dinyatakan sebagai absorbansi per menit.

### Penentuan aktivitas enzim PPO (Flick, et al., 1977)

Ekstraksi enzim dilakukan sebagai berikut : 15 gram bahan diiris dan dihomogenisasi dalam 60 ml air terdeionisasi selama 30-60 detik pada suhu 0 °C dengan *food blender*, kemudian disaring dengan kertas saring secepatnya. Filtrat ditempatkan dalam tabung yang direndam dalam es yang tepat mencair.

Aktivitas enzim PPO ditentukan dengan cara Coseteng & Lee (1987) sebagai berikut : 2,6 ml buffer Na asetat-asam setat 0,01 M, pH 5,0 ditempatkan dalam tabung reaksi dan suhunya diatur 25 °C. Ditambahkan 0,3 ml katekol 0,5 M dan ekstrak enzim sebanyak 0,1 ml. Perubahan absorbansi campuran pada 420 nm diukur selama 3 menit. Satu unit

aktivitas enzim adalah perubahan absorbansi sebesar 0,001 per menit per ml ekstrak enzim.

### Pengukuran aktivitas enzim PAL

Ekstraksi enzim PAL dilakukan dengan menambahkan buffer EPPS yang mengandung 10 mM 2-merkpto ethanol dan 5 µM piridoksal fosfat. Buffer yang ditambahkan sebanyak 5-10 kali pada 5 gram bahan yang dilumatkan dengan mortir. Selanjutnya campuran disentrifus pada kecepatan 10.000 G selama 15 menit. Supernatan yang didapat selanjutnya dimasukkan kantong dialisis. Proses dialisis dilakukan pada 4 °C dengan larutan yang mengandung 5 mM buffer EPPS pH 8,5, 5 mM 2-merkpto ethanol dan 5 µM piridoksal fosfat (Hyodo & Fujinami, 1989 dan Hyodo *et al.*, 1989).

Penentuan aktivitas enzim PAL dilakukan secara spektrofotometri (Hyodo *et al.*, 1989), dengan mengukur kenaikan absorbansi campuran reaksi yang terdiri atas 50 mM buffers EPPS pH 8,5, 10 mM fenil alanin dan larutan yang mengandung enzim dengan volume keseluruhan sebesar 6 ml, pada 290 nm. Campuran reaksi diinkubasikan pada 40 °C. Aktivitas enzim dinyatakan sebagai n mol asam trans sinamat yang terbentuk per jam per gram bahan.

### Penentuan senyawa fenolat

Penentuan senyawa fenolat terdiri atas dua bagian yaitu ekstraksi senyawa fenolat (modifikasi dari Mapson *et al.*, 1985; dalam Coseteng & Lee, 1987) dan penentuan senyawa fenolat (Weurman & Swain, 1955 dalam Coseteng & Lee, 1987).

Untuk mengekstraksi senyawa fenolat, 2,5 gram bahan dihancurkan dalam *super blender* dengan 5 ml alkohol 80 % pada suhu kamar. Homogenat dididihkan dalam penangas air selama 10 menit dan disaring dengan kertas saring Whatman no 4. Residu diekstraksi lagi dengan alkohol seperti di atas dan semua filtrat dikumpulkan, setelah dingin diencerkan volumenya hingga 12,5 ml.

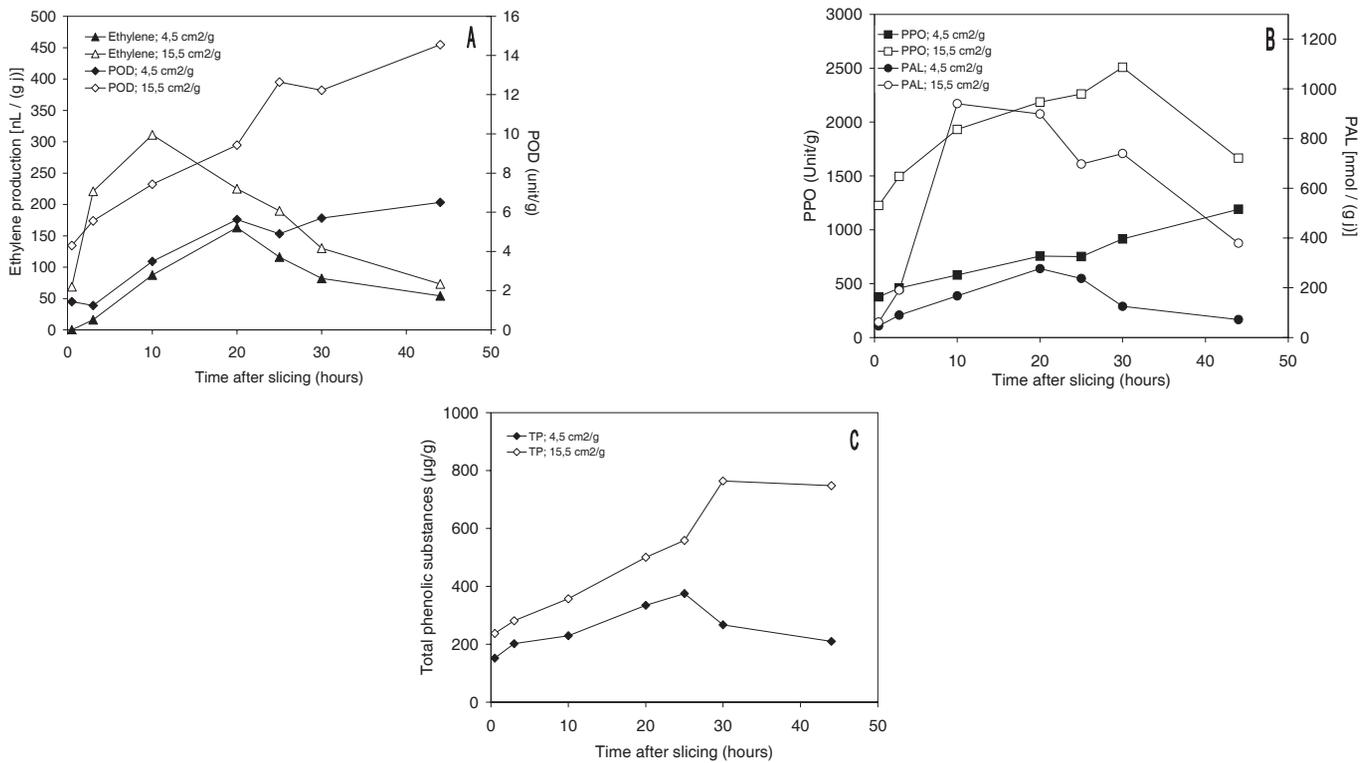
Untuk menentukan kandungan asam klorogenat, filtrat diencerkan 10 kali volumenya, diambil 1 ml, ditambahkan 10 ml akuades, 2,0 ml reagen Folin Ciocalteau fenol; digojog dan dibiarkan 10 menit. Akhirnya ditambahkan 2 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh, diaduk dan dibiarkan selama 1 jam, kemudian ditera absorbansinya pada 640 nm dan dibandingkan dengan kurva standar asam klorogenat.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Etilen luka, aktivitas POD, PPO, PAL, dan senyawa fenolat

Untuk mengetahui kaitan antara etilen luka dengan aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL pada berbagai luas muka luka, maka hasil penelitian sebelumnya (Murdijati-Gardjito, 2001) digunakan sebagai pembanding.

Hasil percobaan disajikan pada Gambar 1A,B, dan C. Terlihat bahwa pada Gambar 1A, selama periode percobaan,



**Figure 1.**

*Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in different wound surface square ratio of mesocarp winter squash*

aktivitas POD makin lama makin tinggi. Meningkatnya aktivitas POD ini lebih besar pada rasio luas muka dan berat bahan yang lebih tinggi. Diperkirakan bahwa etilen luka memicu aktivitas POD. Hal ini terbukti oleh kenyataan bahwa walaupun produksi etilen luka telah menurun, aktivitas POD pada kedua macam rasio yang diteliti selalu menunjukkan peningkatan hingga periode percobaan selesai ( $2 \times 44$  jam). Pada enzim PPO terjadi kecenderungan yang sama dengan POD, tetapi pengaruh rasio luas muka luka dan berat bahan segar terlihat lebih besar pada aktivitas PPO. Lebih kurang kenaikan aktivitas PPO ini proporsional dengan rasio luas muka luka dan berat jaringannya.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa pada saat awal setelah pengirisan, pengaruh luka dan etilen luka lebih besar pada kenaikan aktivitas POD. Makin lama, terlihat pengaruh etilen luka makin kecil pada kedua macam rasio luas muka luka dan berat bahan, tetapi pengaruh lukanya yang lebih menonjol. Hal ini dibuktikan dengan fakta bahwa aktivitas POD jauh lebih tinggi (dua setengah kali lipat) pada luas muka tiga kali lebih besar. Selain itu, pada saat etilen lukanya telah menurun (masing-masing setelah 10 dan 20 jam) dalam percobaan ini, aktivitas POD tetap meningkat. Jadi, etilen luka yang dihasilkan oleh jaringan labu kuning ternyata cukup untuk memicu aktivitas POD yang

selanjutnya mampu meningkat sesuai dengan tuntutan jaringannya dalam merespon luka. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Hyodo & Yang (1971), serta Hyodo *et al.* (1993), baik pada jeruk maupun labu kuning.

Kaitan antara aktivitas PPO dan etilen luka pada mesokarp labu kuning berbeda dengan POD. Pada aktivitas PPO ini, etilen luka tidak terlalu kuat mempengaruhinya. Hal ini ditunjukkan dengan adanya kecenderungan kenaikan aktivitas PPO tersebut (Tabel 1) tanpa mencapai puncak kenaikannya seperti produksi etilen luka. Tidak seperti POD, PPO juga tidak menunjukkan lonjakan kenaikan aktivitas. Namun pada rasio luas muka luka tiga kali lipat terjadi kenaikan aktivitas PPO hampir tiga kali lipat juga. Dengan demikian etilen luka pada mesokarp labu kuning meningkatkan aktivitas PPO dan ternyata luka jaringan lebih memperkuat terjadinya peningkatan aktivitas PPO tersebut.

Pengaruh etilen luka pada PAL berbeda dengan POD dan PPO, dalam hal ini PAL memerlukan waktu jeda. Ini ditunjukkan dengan fakta (Tabel 1) bahwa pada saat awal pengirisan (perluasan) hingga 30 menit, pada rasio luas muka luka dan berat bahan yang berbeda, aktivitas PAL sama, tetapi setelah 3 jam, aktivitas enzimnya jauh lebih besar pada rasio yang lebih tinggi. Lagi pula, pada rasio yang lebih tinggi, produksi

Table 1. Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in different wound surface square ratio of mesocarp winter squash

Phase /shape	Time after slicing (hours)	Flowthrough system at 25 °C				
		Ethylene [nL/(gj)]	POD (Unit/g)	PPO (Unit/g)	PAL [nmol/(gj)]	Tot Phen (µg/g)
<b>I. Cylinder</b> t = 2 cm d = 14 mm Surface square = 11,8 cm <sup>2</sup> /Cylinder LM/BS = 4,5 cm <sup>2</sup> /g	0,5	0,0 <sup>h</sup>	1,44 <sup>j</sup>	376,3 <sup>h</sup>	46,42 <sup>i</sup>	152,0 <sup>h</sup>
	3	16,13 <sup>h</sup>	1,24 <sup>j</sup>	459,7 <sup>hi</sup>	89,89 <sup>hi</sup>	202,03 <sup>g</sup>
	10	87,20 <sup>ef</sup>	3,49 <sup>i</sup>	579,3 <sup>gh</sup>	167,73 <sup>fg</sup>	229,72 <sup>fg</sup>
	20	163,05 <sup>dc</sup>	5,63 <sup>f</sup>	756,3 <sup>gf</sup>	276,99 <sup>d</sup>	334,75 <sup>d</sup>
	25	115,99 <sup>ef</sup>	4,90 <sup>f</sup>	750,3 <sup>gf</sup>	237,52 <sup>de</sup>	375,21 <sup>d</sup>
	30	81,96 <sup>ef</sup>	5,70 <sup>g</sup>	915,7 <sup>f</sup>	125,15 <sup>gh</sup>	267,21 <sup>ef</sup>
	44	53,91 <sup>g</sup>	6,51 <sup>e</sup>	1190,7 <sup>e</sup>	72,232 <sup>hi</sup>	210,22 <sup>g</sup>
	cv =	27,2%	6,55%	14,54%	18,4%	10,27%
<b>II. Disk</b> t = 2 mm d = 9 mm Surface square = 1,84 cm <sup>2</sup> /Cylinder LM/BS = 15,5 cm <sup>2</sup> /g	0,5	68,78 <sup>g</sup>	4,30 <sup>h</sup>	1225,7 <sup>e</sup>	61,58 <sup>i</sup>	237,47 <sup>efg</sup>
	3	220,88 <sup>b</sup>	5,56 <sup>f</sup>	1495 <sup>d</sup>	190,64 <sup>ef</sup>	281,29 <sup>e</sup>
	10	310,75 <sup>a</sup>	7,43 <sup>d</sup>	1931,0 <sup>c</sup>	940,93 <sup>a</sup>	357,43 <sup>d</sup>
	20	225,02 <sup>b</sup>	9,42 <sup>c</sup>	2185,3 <sup>b</sup>	898,90 <sup>a</sup>	500,42 <sup>c</sup>
	25	189,76 <sup>bc</sup>	12,64 <sup>b</sup>	2259,7 <sup>b</sup>	697,78 <sup>b</sup>	558,95 <sup>b</sup>
	30	130,18 <sup>dc</sup>	12,22 <sup>b</sup>	2508,0 <sup>a</sup>	740,22 <sup>b</sup>	764,18 <sup>a</sup>
	44	73,22 <sup>g</sup>	14,55 <sup>a</sup>	1664,3 <sup>d</sup>	379,10 <sup>c</sup>	747,88 <sup>a</sup>
	cv =	20,79%	3,51%	6,19%	5,2%	5,42%

**Note:**

1. All value were average from 5 repetition. Varians analysis in coloum continued with DMRT at 5 % (small letter). Same letter are not different.
2. t = thick; d = diameter; LM = Surface square; BS = Fresh weight; cv = *coeficient of variation*

etilen juga lebih besar, sehingga aktivitas enzim PAL meningkat jauh lebih besar saat etilen luka mencapai puncaknya (Gambar 1B). Dalam percobaan ini terlihat bahwa pengaruh etilen pada enzim PAL terjadi setelah 30 menit hingga 3 jam setelah pengirisan dan aktivitas PAL tersebut meningkat pesat hingga produksi etilen luka mencapai puncaknya. Selanjutnya aktivitas PAL cenderung menurun sedikit demi sedikit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa PAL perlu periode jeda, sebelum aktivitasnya meningkat. Hal ini karena diperlukan waktu tertentu setelah pengirisan untuk membentuk protein penyusun PAL. Setelah enzim terbentuk, diperkirakan PAL terpicu oleh etilen luka, hal ini sangat jelas terlihat pada Gambar 1B pada rasio luas muka luka yang lebih besar. Aktivitas PAL yang tertinggi pada kedua macam rasio luas muka luka yang diteliti dicapai pada saat yang sama dengan puncak produksi etilennya. Ini mendukung perkiraan bahwa etilen luka memicu dan meningkatkan aktivitas PAL. Fakta ini lebih diperkuat dengan keadaan, pada saat etilen lukanya menurun, aktivitas PAL juga cenderung menurun. Meningkatnya aktivitas PPO dan PAL pada luas muka luka yang lebih besar diikuti peningkatan pembentukan senyawa fenolat.

Dari hasil penelitian yang dikemukakan di atas secara umum dapat dikatakan bahwa etilen luka pada mesokarp labu kuning mempengaruhi dan meningkatkan aktivitas ketiga enzim yang diteliti dan terbentuknya senyawa fenolat. Enzim POD yang selain mengkatalisis reaksi oksidatif yang berkaitan dengan perubahan warna aroma serta cita rasa juga berperan dalam pembentukan lignin sebagai upaya penyembuhan luka pada jaringan tanaman.

Perubahan senyawa fenolat yang disajikan pada Gambar 1C menunjukkan bahwa ada kecenderungan peningkatan senyawa fenolat untuk semua luas muka luka jika irisan dibiarkan berada dalam udara biasa. Pada irisan dengan rasio luas muka yang lebih besar terbentuk klorogenat yang lebih banyak. Namun, secara pasti sulit untuk menyatakan laju pembentukan klorogenat ini mengingat senyawa tersebut sebagian telah mengalami proses perubahan lebih lanjut.

**Etilen luka, aktivitas POD, PPO, PAL, serta senyawa fenolat pada berbagai variasi perlakuan**

Dalam bagian ini dikaji kaitan antara produksi etilen, aktivitas POD, PPO, dan PAL pada berbagai perlakuan irisan

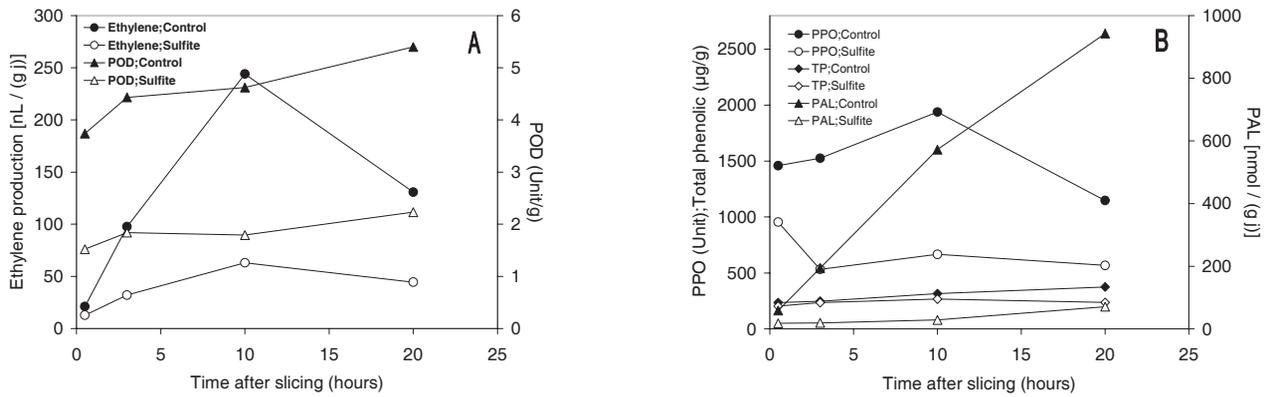


Figure 2.

Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in disk mesocarp winter squash with dipping in metabisulfite solution 0,25 %

mesokarp labu kuning. Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 2 sampai dengan 5 berdasarkan macam dan kombinasi perlakuan, serta Gambar 6 (A dan B) dan 7 (A, B, dan C) berdasarkan senyawa yang diteliti. Dari Gambar 2 dapat diketahui bahwa perendaman dalam larutan Na-metabisulfit 0,25 % selama 30 menit ternyata mampu menekan produksi etilen luka maupun aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL, tetapi tidak jelas pada senyawa fenolat.

Blansing dengan pemanasan menggunakan uap air (suhu 85°C selama 1 menit) seperti terlihat pada Gambar 3 menunjukkan sedikit penurunan produksi etilen luka dan aktivitas ketiga enzim yang diteliti. Tidak jelas pula pengaruh peng-uapan pada kandungan senyawa fenolat. Dibandingkan dengan pencelupan dalam larutan metabisulfit, blansing dengan uap kurang dapat menekan produksi etilen luka maupun aktivitas enzim. Seperti halnya perendaman dalam Na-metabisulfit pada

Gambar 4 dapat ditunjukkan bahwa blansing dengan pencelupan air panas (suhu 95 °C selama 5 detik) mampu menekan produksi etilen dan aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL, tetapi setelah 10 jam aktivitas POD meningkat.

Kombinasi kedua macam perlakuan (sulfit dan uap serta sulfit dan celup) mampu menurunkan produksi etilen dan aktivitas enzim (Gambar 5 dan 6). Jika keduanya dibandingkan dengan kombinasi sulfit dan uap kurang dapat menekan aktivitas enzim PAL. Jika dilihat secara bersama-sama, produksi etilen pada semua perlakuan (Gambar 7) maka pada perlakuan pembiansing dengan uap meskipun produksi etilennya menurun, tetapi tetap paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pada Gambar 7 terlihat bahwa produksi etilen yang sedikit lebih tinggi pada perlakuan blansing dengan uap berkaitan dengan aktivitas enzim yang paling tinggi di antara sampel yang diteliti.

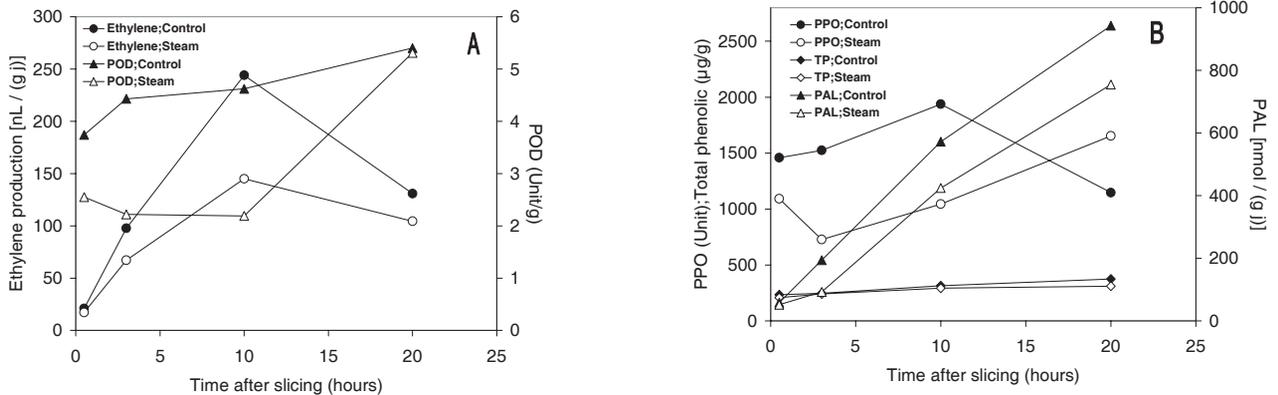
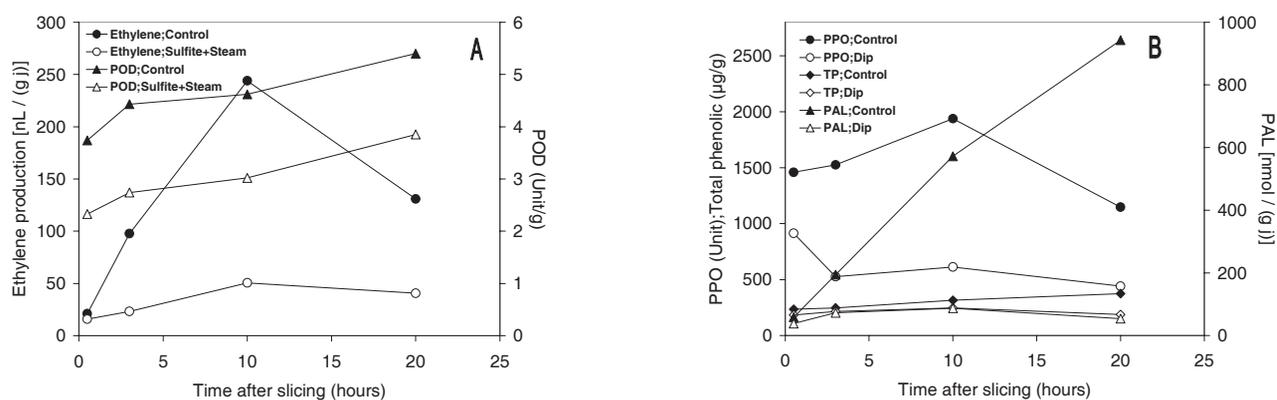


Figure 3.

Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) disk mesocarp winter squash with steam blanching (85 °C, 1min)

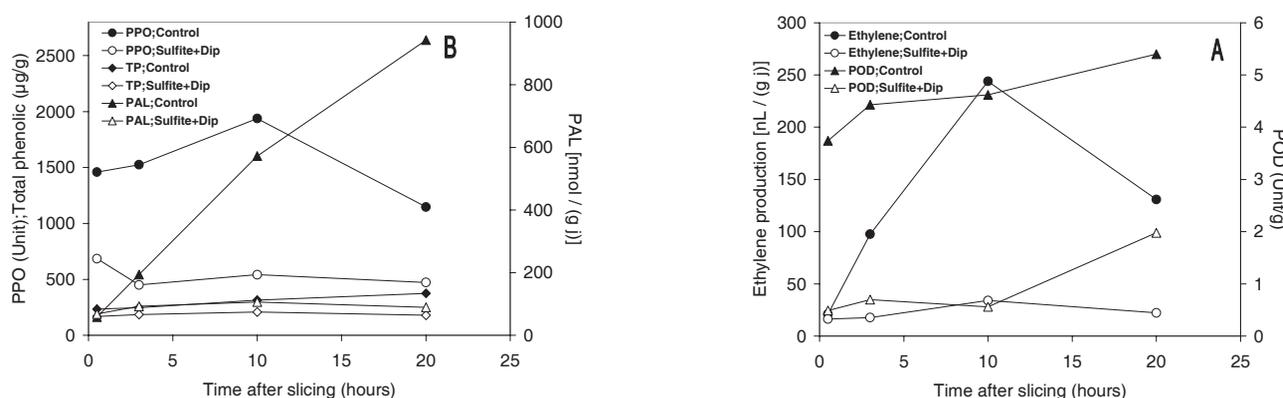


**Figure 4.**

*Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in disk mesocarp winter squash with dipping in hot water (95 °C,5 sec)*

Pemblansingan dengan pencelupan air panas (95°C) selama 5 detik cukup dapat menekan produksi etilen dan aktivitas enzim. Kedua cara blansing yang dipakai mungkin mempunyai dampak yang berbeda pada enzim yang ada. Pada suhu tertentu, dalam hal ini 85 °C dan 95 °C, dapat terjadi perubahan sifat protein penyusun enzim, sehingga enzimnya dapat berubah, baik sifat maupun spesifitasnya. Pada bunga pisang, PPO memiliki lebih dari satu isozim setelah pem-

blansingan (Oba, 1994). Selama pemanasan dengan uap dan pencelupan, kemungkinan *heat-shock* pada protein penyusun enzim pada mesokarp labu kuning dapat terjadi. Hal ini dapat menjelaskan, terjadinya kenaikan aktivitas enzim POD dan PAL, setelah blansing dengan uap dan pencelupan, yaitu panas dapat menyebabkan terbentuknya isozim dari PAL dan POD seperti yang terjadi pada PPO bunga pisang tersebut.



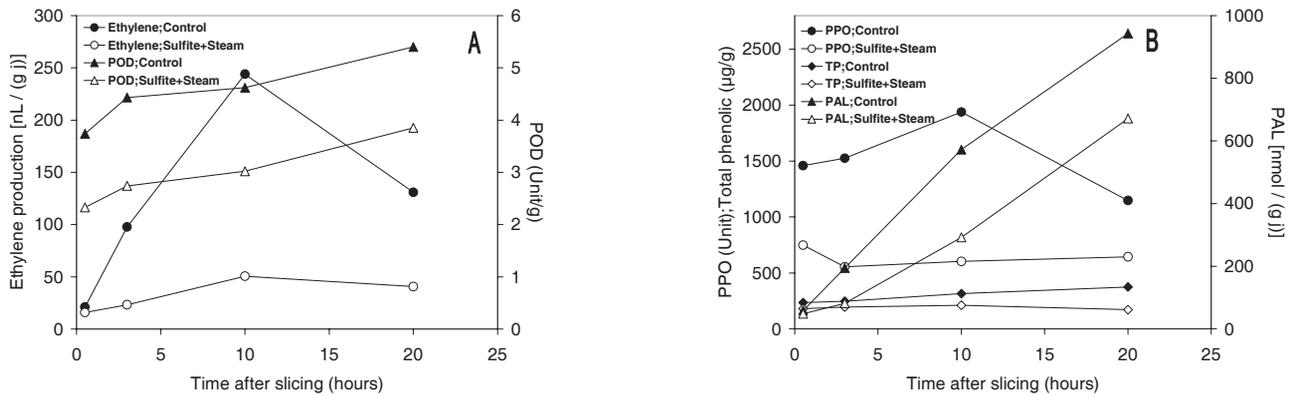
**Figure 5.**

*Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in disk mesocarp winter squash with dipping in metabisulfite solution 0,25 % and hot water (95 °C, 5 sec)*

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa perlakuan yang mampu menekan produksi etilen luka pada umumnya akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini karena produksi etilen luka tidak mampu memicu aktivitas enzim. Blansing dengan uap yang terbukti kurang mampu

menekan produksi etilen diikuti oleh aktivitas enzim POD, PPO, dan PAL yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lain.

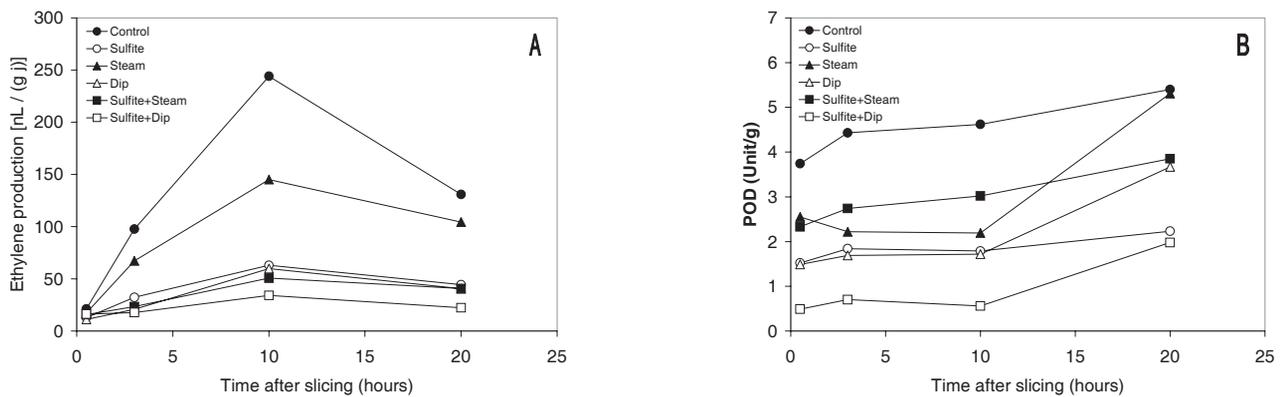
Perlakuan perendaman dalam larutan metabisulfit ternyata cukup efektif untuk menurunkan etilen dan juga aktivitas enzim. Hal ini dapat dimengerti karena ternyata enzim ACC-



**Figure 6.**  
Ethylene production, peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in disk mesocarp winter squash with dipping in metabisulfite solution 0,25 % and steam blanching (85 °C, 1 min)

oksidase bersifat mudah larut dalam air, sehingga ada kemungkinan terlarutnya enzim ACC-oksidase ini menghambat produksi etilen luka. Kombinasi perlakuan perendaman sulfit dan pencelupan dalam air panas yang dilakukan dalam percobaan ini memberi hasil yang paling baik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan perendaman dalam Na-metabisulfit dan pencelupan dalam air pada suhu

95 °C selama 5 detik merupakan cara yang paling efektif dalam menekan produksi etilen luka dan menghambat aktivitas enzim. Kaitan antara perlakuan yang dipilih dan kandungan senyawa fenolat tidak terlalu jelas, mengingat ada kemungkinan senyawa tersebut merupakan senyawa antara dan menjadi substrat reaksi fisiologi berikutnya.



**Figure 7.**  
Ethylene production and peroxidase (POD) in disk mesocarp winter squash with different treatment

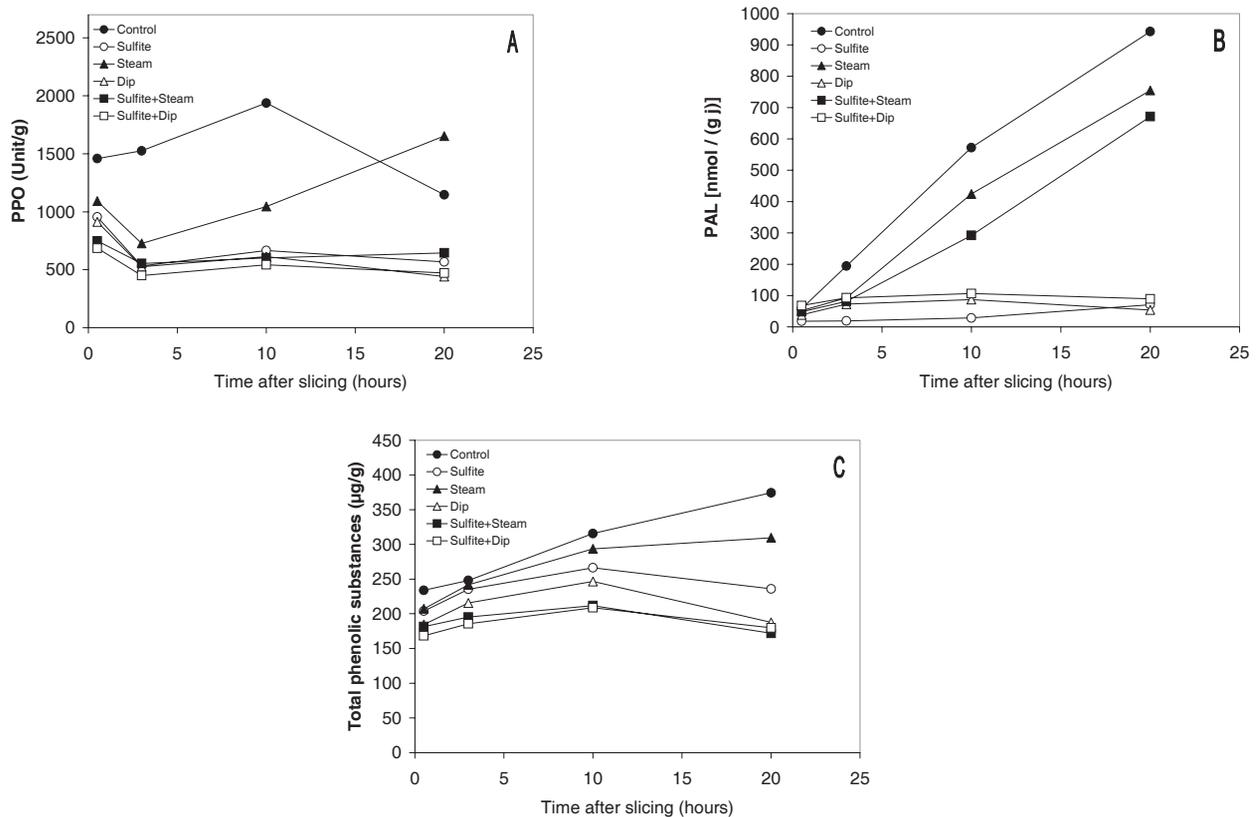


Figure 8.

Polyphenol oxidase (PPO), phenyl alanine amonia lyase (PAL), and fenolic content (TP) in disk mesocarp winter squash with different treatment

## KESIMPULAN

Pada irisan mesokarp labu kuning yang diteliti didapatkan bahwa:

1. Etilen luka mempengaruhi aktivitas enzim peroksidase (POD), polifenol oksidase (PPO), dan fenilalanin amonia liase (PAL). Dalam hal ini POD dipicu oleh etilen luka, PPO meningkat akhirnya secara proporsional dengan luas muka luka, dan PAL perlu waktu jeda 3 jam dan setelah itu aktivitas PAL meningkat sejalan dengan rasio luas muka luka jaringannya.
2. Pembentukan senyawa fenolat yang diperhitungkan sebagai asam klorogenat makin tinggi pada jaringan luka dan peningkatan ini sebanding dengan peningkatan rasio luas muka luka dengan berat bahan.
3. Perlakuan pemanasan menggunakan air atau uapan dengan atau tanpa Na metabisulfit, semuanya menghambat produksi etilen luka dan semua aktivitas enzim.
4. Kombinasi perlakuan perendaman dalam Na-metabisulfit dan pencelupan dalam air pada suhu 95°C selama 5 detik merupakan cara yang paling efektif dalam menekan produksi etilen luka dan menghambat aktivitas enzim.

## DAFTAR PUSTAKA

- Coseteng, M.Y., & C.Y. Lee. 1987. Changes in apple polyphenol concentration in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* Vol. 52.4. 985-989.
- Flick, GJ., J.R Robert, L. Ory, & J. Allen St. Angelo. 1977. Comparison of nutrient composition and of enzyme activity in purple, green and white eggplants. *J. Agric. Food Chem* Vol. 25. No.1. 117-120.
- Golan, A., Varda Kahn, & A.Y. Sadvovsky. 1977. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison Between The Fuerte and Lerman Cultivars. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 25 No.6.1253-1260.
- Grishbach, H. 1981. Lignin, In: E.E. Conn (eds.). *The Biochemistry of Plants*. Acad. Press. 457-478.
- Hyodo, H. 1977. Ethylene production by albedo tissue of Satsuma mandarin (*Citrus anshia*) fruit. *Plant. Physiol.* 59: 111-113.
- Hyodo, H. 1994. Biochemical basis for stress responses of harvested perishables in the tropics. In: Uritani, I., *Post harvest Biochemistry of Plant-Material in the Tropics*. 121-133, Jpn. Sci. Press. Tokyo.

- Hyodo, H., & H. Fujinami. 1989. The effects of 2-5 norbornadiene on the induction of the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and of phenylalanine ammonia lyase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol.* 30(6): 857-860.
- Hyodo, H., & S.F. Yang. 1971a. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedling. *Plant Physiol.* 47: 765-7770.
- Hyodo, H., & S.F. Yang. 1971b. Ethylene-enhanced formation of cinnamic acid 4-hydroxylase in excised pea epicotyl tissue. *Archives of Biochem. & Biophysics.* 143: 338-339.
- Hyodo, H., C. Hashimoto, S. Morozumi, W. Hu, & K. Tanaka. 1993. Characterization and induction of the activity of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate oxidase in the wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol.* 34 (5): 667-6671.
- Hyodo, H., H. Fujinami, E. Okada, & T. Mochizuki. 1989. Wound-induced ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in mesocarp Tissue of *Cucurbita maxima*. In: H. Clygster *et al.* (eds.), *Biochemicals and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants*. Kluwer Academic Publ. 229-236.
- Hyodo, H., K. Tanaka, & J. Yoshisaka. 1985. Induction of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase in wounded mesocarp tissue of winter squash fruit and effects of ethylene. *Plant Cell Physiol.* 26: 161-167.
- Hyodo, H., K. Tanaka, & K. Watanabe. 1983. Wound-induced ethylene production & 1-amino cyclopropane 1-carboxylic acid synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit. *Plant & Cell Physiol.* 24 (6): 963-969.
- Hyodo, H., N. Ikeda, A. Nagatani, & K. Tanaka. 1983. The increase in alcohol dehydrogenase activity and ethanol content during ripening of banana fruit. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 52: 196-199.
- Imaseki, H., T. Asahi, & I. Uritani. 1968. Investigation on the possible inducers of metabolic changes in injured plant tissues. In: Tokuzo Hirai (Eds.), *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury*. Phytopathological society of Japan. Tokyo. 189-201.
- Mudijati-Gardjito, 2001. *Produksi Etilen Luka pada Mesokarp Labu Kuning*. Laporan penelitian yang tidak dipublikasikan PHTRC-UPLB.
- Oba, K, 1994. Polyphenol oxidase in banana fruit and buds, In Uritani, I. (ed.) *Post Harvest Biochemistry of Plant food-materials in the Tropics*. 35-46. *Jpn. Sci. Soc. Press*, Tokyo.
- Tanaka, Y. & I. Uritani. 1977. Synthesis and Turnover of phenylalanine ammonia-lyase in root tissue. *Eur. J. Biochem.* 73: 255-260.
- Weurman, C., & T. Swain. 1955. Changes in the enzyme browning of bramley's seedling apples during their developments. *J. Sci. Food Agric.*, 6. 186.
- Yang, S.F., & K. Pratt. Harlan. 1978. *The physiology of ethylene in wounded plant tissues*. Water de Gruyter & Co., Berlin. New York.