

TIDAK DIPINJAMKAN KELUAR

KARAKTERISASI POLIFENOL OKSIDASE DARI KULIT BUAH LANGSAT
(*Lansium domesticum*) DENGAN MENGGUNAKAN
BERBAGAI SUBSTRAT

SKRIPSI



MILIK PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JEMBER

Diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk
menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
pada Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Ana Damayanti

9515101025

Asal : Hadiah
Pembelian
Terima Tgl: 19 MAY 2000
No, Induk : PPT. 2000 - 10.163

S
Klass
634.65
DAM
R

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
MARET, 2000

MOTTO:

- ★ Segala perkara dapat kutanggung di dalam Dia yang memberi kekuatan kepadaku. (Filipi 4:13).
- ★ Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur. (Filipi 4:6).
- ★ Karena masa depan sungguh ada, dan harapanmu tidak akan hilang. (Amsal 23:18)

PERJALANAN PANJANG LEWATI HARI

TERUSIK MIMPI LANGKAH NYARIS TERHENTI

ASA YANG TERSISA 'TUK RAH CITA

MENCIPTA KARYA KUPERSEMBahkan PADAMU

- ♥ Tuhan Allah-ku yang Maha Kuasa, Engkau adalah segalanya bagiku.
- ♥ yang tercinta Papa & Mama (Drs. Sutoko & Dra. A. Annie Tumauken) yang selalu berusaha memberikan yang terbaik untukku, terima kasih untuk curahan kasih sayang dan doa.
- ♥ Kakak-kakakku tercinta (Mbak Ita & Maz Franky, Maz Anto dan Maz Indra), terima kasih untuk cinta kasih dan suka cita di antara kita. Juga untuk "Si Kecil" yang segera menjelang, Kami sangat menantikanmu
- ♥ Seseorang terkasih yang akan selalu ada dalam hatiku. *What can I say ... Only Heaven knows*
- ♥ Sahabat penelitianku, Andry dan Zuana, terima kasih.
- ♥ yang tersayang sahabat tempat "curhat"-ku, Mbak Dyah "Mick" K., Dyah Andarini juga buat Mas Ian memotivasiku, Mas Age dan Mas Jack sahabat dalam kesulitanku serta adik-adikku Erdiana & Pinkan, Barbara, Lily dan teman-teman Gerakan Pemuda.
- ♥ Alumni yang kebanggaan Universitas Jember.

DOSEN PEMBIMBING:

Ir. Hj. Siti Hartanti, MS. (DPU)

Dr.Ir. Bambang Sugiharto, MAgr.Sc. (DPA I)

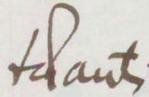
Ir. Setiadji (DPA II)

Diterima oleh:
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember
sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada:

Hari : Senin
Tanggal : 27 Maret 2000
Jam : 14.00 WIB
Tempat : Fak. Teknologi Pertanian
Universitas Jember

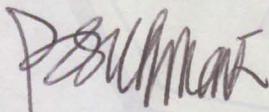
Tim Penguji,
Ketua



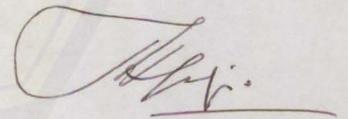
Ir. Hj. Siti Hartanti, MS
NIP. 130 350 763

Anggota I

Anggota II



Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgrSc.
NIP. 131 131 021



Ir. Setiadi
NIP. 130 531 969

Mengetahui,
Dekan



Ir. Wagito
NIP. 130 516 238

KATA PENGANTAR

Penulis memanjatkan puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas berkat dan anugerahNya, sehingga Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) yang berjudul **Karakterisasi Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung (*Lansium domesticum*) dengan Menggunakan Berbagai Substrat** dapat terselesaikan.

Karya Ilmiah Tertulis ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Jember.

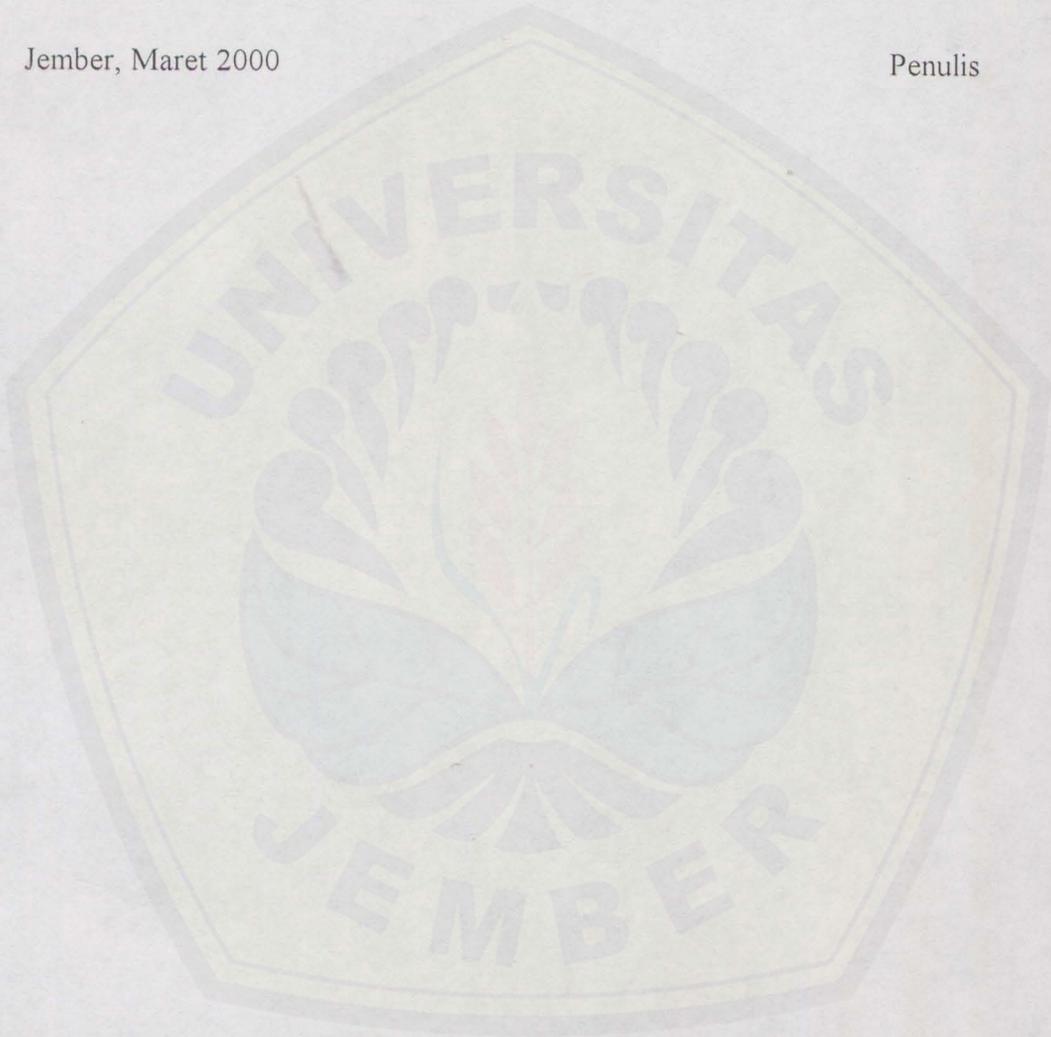
Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu tersusunnya skripsi ini terutama kepada yang terhormat:

1. Ibu Ir. Hj. Siti Hartanti, MS., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan dan bantuan secara moril dan materiil hingga terselesaikannya skripsi ini.
2. Bapak Dr.Ir. Bambang Sugiharto, MAgrSc., selaku Dosen Pembimbing Anggota I yang telah memberikan bimbingan dan arahan hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Ir. Setiadji, selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah memberikan bimbingan dan saran yang berguna dalam penyempurnaan penyusunan skripsi ini.
4. Staf Laboratorium yang terlibat dalam penelitian, Mas Tri, Mas Budi, Mbak Sari juga Mbak Wim.
5. Senioriku, Mbah Dyah, Mbak Novita dan Mas Encik terima kasih atas segalanya.
6. Rekan-rekan di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember: Susy, Made, Mbak Tutik, Mbak Pepti, Mbak Hamidah, Mas Yanto, Mas Sigit, Mas Husni, Juned, Mas Ahyat juga Mas Yanto.
7. Mas-mas arek Mapensa, Mas Nanang, Mas Alfa, Mas Sofyan, Mas Iwak, Mas Toha juga Adik Ibnu "Brutu" sukses selalu.
8. Mbak Hesti, Bintari, Eny, Yanti, Unyil dan rekan-rekan Tepe'95 lainnya.

Penulis berharap semoga Karya Ilmiah Tertulis ini dapat memberikan manfaat. Penulis sadar bahwa tulisan ini jauh dari kesempurnaan, karena itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaan Karya Ilmiah Tertulis ini.

Jember, Maret 2000

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
MOTTO	ii
PERSEMBAHAN	iii
DOSEN PEMBIMBING	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
RINGKASAN	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Kegunaan Penelitian	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN	8
3.1 Bahan dan Alat Penelitian	8
3.1.1 Bahan Penelitian	8
3.1.2 Alat Penelitian	8
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	8
3.3 Metode Penelitian	8
3.3.1 Purifikasi Parsial Polifenol Oksidase	8
3.3.2 Pengukuran Aktivitas Polifenol Oksidase	9
3.3.3 Penentuan Protein	10

3.3.4 Karakterisasi Polifenol Oksidase	12
3.3.4.1 Afinitas Enzim terhadap Substrat	12
3.3.4.2 Pengaruh Senyawa Penghambat	12
3.3.5 Elektroforesis (SDS-PAGE)	12
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Purifikasi Parsial Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung	13
4.1.1 Ekstraksi dan Presipitasi	13
4.1.2 Kromatografi Kolom Sepacryl	13
4.1.3 Elektroforesis (SDS-PAGE)	15
4.2 Karakterisasi Polifenol Oksidase	16
4.2.1 Afinitas Polifenol Oksidase terhadap Substrat	16
4.2.2 Pengaruh Senyawa Penghambat	19
V. KESIMPULAN DAN SARAN	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas Relatif Polifenol Oksidase terhadap Katekol.....	5
2. Karakter Purifikasi Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung	14
3. Substrat Spesifik dan Data Kinetik Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung	18
4. Pengaruh Beberapa Senyawa Penghambat Pada Aktivitas Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung	20
5. Data Kinetik (nilai Km) Polifenol Oksidase Kulit Buah Langsung dengan beberapa Inhibitor	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram alir purifikasi Polifenol Oksidase dari kulit buah langsung	11
2. Pola elusi aktivitas Polifenol Oksidase pada kolom sepacryl	15
3. SDS-PAGE dari Polifenol Oksidase kulit buah langsung, M (marker), A (ekstrak kasar), B (fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), C (fraksi kolom sepacryl I), D (fraksi kolom sepacryl II)	16
4. Plot Lineweaver-Burk dari Polifenol Oksidase I dengan menggunakan berbagai substrat	17
5. Plot Lineweaver-Burk dari Polifenol Oksidase II dengan meng- gunakan berbagai substrat	17
6. Plot Lineweaver-Burk dari Polifenol Oksidase I dengan menggunakan berbagai inhibitor	21
7. Plot Lineweaver-Burk dari Polifenol Oksidase II dengan meng- gunakan berbagai inhibitor	22

RINGKASAN

Ana Damayanti (9515101025) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian – Universitas Jember, **“Karakterisasi Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung (*Lansium domesticum*) dengan Menggunakan Berbagai Substrat“**, di bawah bimbingan Ibu Ir. Hj. Siti Hartanti, MS. sebagai DPU dan Bapak Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgr.Sc. sebagai DPA.

Polifenol Oksidase (EC. 1.10.3.1) adalah enzim yang dapat menyebabkan timbulnya warna gelap pada jaringan tanaman. Enzim ini menggunakan molekul oksigen dan mengkatalisa reaksi o-hidroksilasi dari monofenol menjadi o-difenol yang disebut dengan aktivitas kresolase dan oksidasi dari o-difenol menjadi o-quinon, yang disebut dengan aktivitas katekolase.

Purifikasi parsial polifenol oksidase dari kulit buah langsung menghasilkan polifenol oksidase I dan II. Polifenol oksidase I memiliki aktivitas spesifik sebesar 188069,27 kU/ mg protein dengan kelipatan pemurnian 32,74 kali dan hasil 22,14% sedangkan aktivitas spesifik polifenol oksidase II sebesar 4589678,095 kU/ mg protein, kelipatan pemurnian 79,89 kali dan hasil 19,77% dari ekstrak kasarnya.

Penentuan nilai K_m dan V_{maks} dengan metode Lineweaver-Burk menunjukkan bahwa polifenol oksidase I dan II memiliki afinitas terbesar terhadap pirokatekol dengan nilai K_m 0,551 mM dan 0,190 mM.

Senyawa penghambat yang efektif digunakan pada polifenol oksidase dari kulit buah langsung adalah asam askorbat, $Na_2S_2O_5$, dan β -merkaptotanol.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Peristiwa pencoklatan yang terjadi pada produk hasil pertanian merupakan masalah yang perlu mendapat perhatian. Hal ini dikarenakan peristiwa pencoklatan ini akan mengakibatkan penurunan mutu produk hasil pertanian tersebut dan pada akhirnya akan menurunkan nilai jualnya.

Peristiwa pencoklatan dibagi dalam dua kelompok yaitu pencoklatan enzimatis dan pencoklatan non enzimatis. Dalam pencoklatan enzimatis, polifenol oksidase mendapat perhatian dari para ahli pangan karena enzim ini selalu terlibat dalam peristiwa pencoklatan pada banyak jenis tanaman (Eskin, 1990).

Pencoklatan ini terjadi karena adanya oksidasi dari senyawa-senyawa fenol (sebagai substrat) yang membentuk quinon oleh polifenol oksidase dengan adanya oksigen (Arslan *et al.*, 1998). Hal ini berhubungan dengan pencoklatan yang terjadi pada sejumlah jaringan tanaman. Hal yang serupa terjadi juga pada jaringan kulit buah langsung (*Lansium domesticum*) yang mudah mengalami kerusakan berupa perubahan warna kulit dari kuning menjadi kecoklatan (Rahayu, 1998).

Polifenol oksidase yang berasal dari jaringan tanaman yang berbeda menunjukkan spesifitas yang berbeda pula terhadap substrat maupun terhadap reaksi penghambatan oleh zat penghambat. Karakterisasi enzim akan sangat berguna dalam usaha menemukan metode yang lebih efektif dalam pengendalian pencoklatan pada tanaman.

Berdasarkan permasalahan di atas maka untuk mengendalikan proses pencoklatan pada buah langsung perlu dilakukan penelitian tentang karakter polifenol oksidase dari kulit buah langsung yang meliputi afinitas polifenol oksidase terhadap substrat maupun pengaruh zat penghambat terhadap aktivitasnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui afinitas polifenol oksidase dari kulit buah langsung terhadap berbagai substrat melalui penentuan nilai konstanta Michaelis Menten (K_m) dan kecepatan maksimum (V_{maks}).
- b. Mengetahui pengaruh zat penghambat terhadap aktivitas polifenol oksidase dari kulit buah langsung.

1.3 Kegunaan Penelitian

Memberikan informasi tentang afinitas polifenol oksidase dari kulit buah langsung terhadap berbagai substrat dan pengaruh zat penghambat terhadap aktivitasnya sehingga dapat dijadikan acuan dalam usaha pengendalian pencoklatan enzimatis pada buah-buahan khususnya pada buah langsung dan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Purifikasi polifenol oksidase adalah suatu metode untuk mengisolasi atau memurnikan polifenol oksidase yang berasal dari jaringan. Menurut Mayer (1978), katekol oksidase adalah enzim yang sulit dipurifikasi karena selama isolasi enzim dapat terjadi reaksi pencoklatan. Beberapa usaha pencegahan reaksi pencoklatan tersebut dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan nitrogen cair juga dan penambahan senyawa pereduksi atau senyawa penyerap fenol seperti PEG, PVP dan PVPP.

Komisi enzim International Union of Biochemistry (IUB) membagi polifenol oksidase dalam dua kategori yaitu lakase atau p-difenol oksigen oksidoreduktase (EC 1.10.3.2) dan katekol oksidase atau o-difenol oksigen oksidoreduktase (EC 1.10.3.1). Katekol oksidase yang juga dikenal sebagai fenolase, polifenol oksidase, tirosinase, katekolase atau kresolase berbeda dengan lakase. Lakase mampu mengoksidasi berbagai jenis substrat termasuk monofenol, trifenol dan asam askorbat sama baiknya seperti pada o- dan p-difenol, sebaliknya o-difenol oksigen oksidoreduktase tidak mampu mengoksidasi p-difenol (Mayer, 1978).

Pada jaringan tanaman polifenol oksidase terdapat pada plastida (Vaughn *et al.*, 1988) dan substrat fenol terutama terdapat pada vakuola, sehingga pencoklatan enzimatik hanya terjadi jika jaringan pembatasnya rusak atau hilang (Chevalier, 1999). Polifenol oksidase adalah enzim yang dapat menyebabkan timbulnya warna gelap pada jaringan tanaman. Enzim ini menggunakan molekul oksigen dan mengkatalisa reaksi o-hidroksilasi dari monofenol (seperti p-kresol) menjadi o-difenol (seperti 4-metilkatekol) yang disebut dengan aktivitas kresolase dan oksidasi dari o-difenol menjadi o-quinon, yang disebut dengan aktivitas katekolase (Sanchez, 1998).

Dengan adanya oksigen polifenol oksidase mampu mengkatalisa dua reaksi yang berbeda, yaitu:

berasal dari sumber yang berbeda menunjukkan spesifitas yang berbeda pula terhadap substrat, seperti yang tampak pada tabel berikut ini:

Tabel 1. Aktivitas Relatif Polifenol Oksidase terhadap Katekol

Substrat	Aktivitas Relatif Terhadap Katekol		
	Kentang	Persik	Daun Kacang-kacangan
a. Kelompok di- atau trifenol			
– Katekol	100	100	100
– 4-metil katekol		51,5	200 - 225
– d-katekin		31,8	
– asam klorogenat	140	22,2	8
– asam kafeat	76,5	0	12,5
– asam protokateik		16,3	0,11
– 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin	54,3	40,5	50
– dopamin		45,6	
– asam galat		25,7	0,22
– pirogalol			85 - 95
b. Kelompok monofenol			
– p-kresol	5,5	0	4
– p-asam kumarat		0	0,5

Sumber: Principles of Enzymologi for The Food Sciences (1972)

Boyer (1998) menyatakan bahwa kecepatan maksimum (V_{maks}) reaksi enzim adalah kecepatan yang dicapai saat seluruh sisi aktif enzim terisi oleh substrat dan konstanta Michaelis Menten (K_m) didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan kecepatan reaksi sebesar $V_{maks}/2$. Nilai K_m dan V_{maks} dapat dihitung menggunakan metode Lineweaver-Burk dengan rumus:

$$1/V = K_m/V_{maks} \cdot [1/S] + 1/V_{maks}$$

Menurut Anderson (1968) nilai K_m dari substrat asam klorogenat untuk o-difenol-oksidas (polifenol oksidase) dari daun tembakau, buah apel dan umbi kentang berada pada kisaran 0,1 – 2,5 mM. Ding *et al.* (1998) melaporkan bahwa nilai K_m dari substrat asam klorogenat pada buah loquat adalah 0,105 mM

Digital Repository Universitas Jember

dan 0,425 mM untuk substrat neosam klorogenat. Kader *et al.* (1997) melaporkan bahwa asam kafeat adalah substrat terbaik bagi polifenol oksidase dari buah blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) dengan aktivitas 100%, kemudian diikuti dengan asam klorogenat (60%) dan pyrocatechol (32,5%) dan tidak ada aktivitas yang tampak saat ditambahkan substrat katekin, asam protokateik, resorsinol dan senyawa monofenol. Arslan *et al.* (1998) melaporkan bahwa polifenol oksidase dari Malatya apricot memiliki afinitas tertinggi terhadap katekol ($K_m = 6,6$ mM) diikuti dengan L-dopa ($K_m = 12,5$ mM) dan asam galat ($K_m = 20$ mM). Polifenol oksidase ini tidak bereaksi dengan monofenol. Besar kecilnya afinitas antara enzim dan substrat dapat dilihat dari nilai K_m , makin besar nilai K_m berarti afinitasnya makin rendah dan begitu pula sebaliknya.

Molekul bukan substrat dapat bereaksi dengan enzim yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Proses penghambatan aktivitas enzim ini dikelompokkan menjadi dua, yaitu penghambatan kompetitif dan non kompetitif, tergantung pada bentuk reaksi penghambatan yang terjadi. Zat penghambat kompetitif memiliki struktur yang mirip dengan substrat dan secara reversibel mengikat pada sisi aktif enzim namun ikatan antara enzim dan zat penghambat (inhibitor) ini tidak dapat membentuk produk. Zat penghambat non kompetitif tidak terikat pada sisi aktif enzim namun terikat pada sisi lain dari molekul enzim. Pengikatan oleh inhibitor non kompetitif ini menyebabkan enzim tidak dapat berfungsi merubah substrat menjadi produk (Boyer, 1990). Zat-zat penghambat untuk polifenol oksidase antara lain adalah asam askorbat, sodium metabisulfit, resorsinol, EDTA dan β -merkaptotanol (Fujita *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1997; Anderson dan Rowan, 1967; Anderson, 1968; Das *et al.*, 1997). Whitaker (1972) menyatakan bahwa asam askorbat berperan sebagai agen pereduksi, dimana mekanisme penghambatannya adalah dengan mereduksi kembali quinon yang terbentuk menjadi o-difenol sedangkan asam askorbat sendiri mengalami oksidasi. Reaksi penghambatan yang sama juga terjadi pada senyawa β -merkaptotanol (Arslan *et al.*, 1998). Madero (1982) melaporkan bahwa bisulfit adalah penghambat kompetitif dari reaksi polifenol oksidase. Hal ini didasarkan bahwa bisulfit mengikat gugus sulfhidril yang berlokasi pada sisi aktif dari enzim.

Mayer dan Harel (1978) menyatakan ada banyak ion pengikat logam (*chelating agent*) yang dapat berinteraksi dengan logam tembaga dari polifenol oksidase, antara lain Na-azid dan EDTA yang mempunyai spesifisitas rendah terhadap tembaga (Cu) namun dapat menghambat aktivitas enzim, sedangkan resorsinol dapat menghambat reaksi enzimatik karena struktur fenolnya yang mirip dengan substrat polifenol oksidase.

Sebagian besar laporan tentang berat molekul dari polifenol oksidase didasarkan atas estimasi (misal dengan metode gel filtrasi dan elektroforesis gel *acrylamide*) menggunakan sampel yang telah dipurifikasi parsial (Mayer, 1978). Berat molekul polifenol oksidase berbeda-beda antara buah yang satu dengan buah lainnya. Diketahui berat molekul daun teh adalah 30, 60, 120 kD; apokat 112 kD; kentang 36 kD; tebu 36 kD dan 130 kD; pisang dan daun apel 42 - 45 kD, 85 - 100 kD dan 150 - 180 kD. Harer *et al.*, (1995) melaporkan tiga bentuk polifenol oksidase dari buah apel dengan berat molekul yang berbeda yaitu 30 - 40, 60 - 70 dan 120 - 130 kD dan polifenol oksidase anggur 55 - 59 kD.

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah kulit buah langsung (*Lansium domesticum*) yang diperoleh langsung dari pohon langsung yang ada di Kabupaten Jember.

Bahan kimia yang digunakan antara lain asam askorbat ($C_6H_8O_6$), $Na_2S_2O_5$, EDTA, resorsinol, β -mercaptoetanol, asam klorogenat ($C_{16}H_{18}O_9$) dan PVPP yang diperoleh dari perusahaan bahan kimia Sigma St.Louis, Mo.(USA) dan E-Merck (Germany), asam kafeat ($C_9H_8O_4$), pirokatekol ($C_6H_4(OH)_2$), L-fenilalanin ($C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$) dan p-kresol ($CH_3C_6H_4OH$) yang diperoleh dari perusahaan bahan kimia yang ada di Jepang.

3.1.2 Alat Penelitian

Pengukuran aktivitas enzim menggunakan spektrofotometer dengan perekam merek Hitachi. Penentuan tingkat kemurnian dan berat molekul enzim menggunakan alat elektroforesis.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler, Universitas Jember pada bulan Juni 1999 - Januari 2000.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Purifikasi Parsial Polifenol Oksidase

Perlakuan ekstraksi berlangsung pada kondisi suhu di bawah $4^{\circ}C$. Metode ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode Das *et al.* (1997) dengan sedikit modifikasi. Enzim diekstraksi dari kulit buah langsung beku (300 gr) dengan menggunakan blender alumunium. Dalam ekstraksi ini ditambahkan nitrogen cair. Setelah halus perlahan-lahan temperatur dibiarkan sedikit naik kemudian ditambahkan 10% PVPP. Setelah itu kulit langsung yang telah halus ini dicampur

dengan 700 ml buffer ekstraksi (buffer Na-fosfat-EDTA pH 7; 0,1 M). Kemudian dihomogenisasi dengan menggunakan homogenizer. Untuk memisahkan bagian yang larut dan tidak larut ekstrak disaring dengan menggunakan kain saring dan disentrifuse pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan dipisahkan sebagai ekstrak kasar.

Ekstrak kasar dipresipitasi dengan menggunakan (NH₄)₂SO₄ 30 - 80% selanjutnya dilakukan filtrasi (*desalting*) dengan menggunakan gel sephadek G-25 (volume 40 ml), sebelumnya diekuilibrasi dengan buffer Na-fosfat 0,05 M, pH 7, 120 ml.

Protein hasil filtrasi dilewatkan melalui kolom *sepacryl* (volume 150 ml), yang sebelumnya juga diekuilibrasi dengan buffer Na-fosfat 0,05 M, pH 7, 450 ml.

Elusi yang keluar difraksionasi dan digunakan untuk karakterisasi polifenol oksidase. Tahapan purifikasi tersebut dapat dilihat pada diagram alir purifikasi polifenol oksidase (Gambar 1).

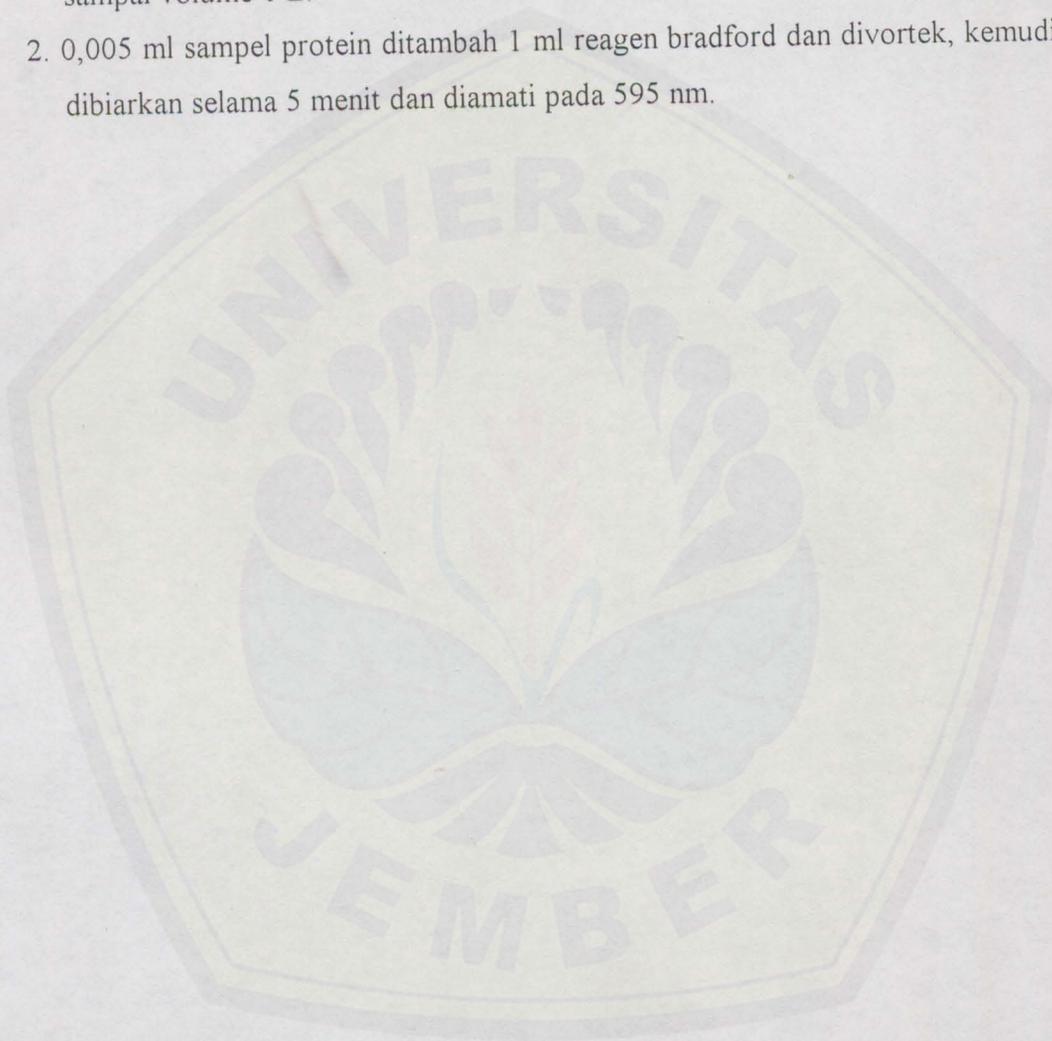
3.3.2 Pengukuran Aktivitas Polifenol Oksidase

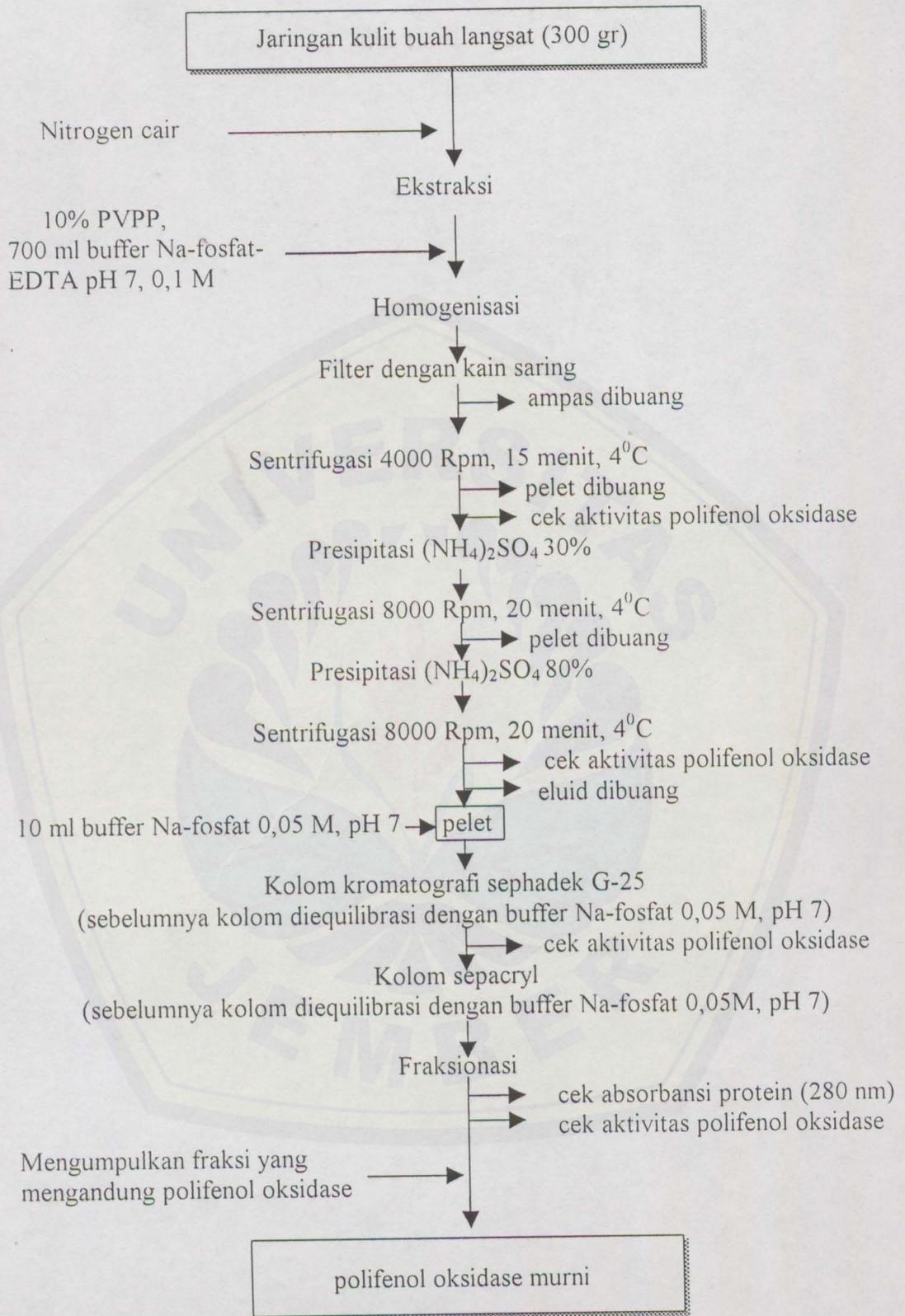
Pengujian enzim menggunakan metode spektrofotometri menurut Cose-teng and Lee (1987). Campuran uji mengandung 0,85 ml larutan 0,05 M buffer Na-fosfat pH 6; 0,1 ml H₂O; 0,03 ml asam klorogenat. Campuran ini dimasukkan ke dalam spektrofotometer, kemudian 0,02 ml enzim ditambahkan dan aktivitas enzim dihitung dari kurva linier yang terbentuk. Satu unit aktivitas enzim adalah sejumlah enzim yang menyebabkan perubahan absorbansi pada 420 nm sebesar 0,001 per menit per ml enzim pada suhu 25⁰C (Coseteng and Lee, 1987).

3.3.3 Penentuan Protein

Penentuan protein menggunakan metode Bradford dengan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar (Bio-Rad, 1984). Prosedur analisa:

1. Pembuatan reagen bradford. CBB G-250 sebanyak 100 mg dilarutkan dalam etanol 95% dan ditambah asam fosfat 85%. Setelah larut ditambahkan aquades sampai volume 1 L.
2. 0,005 ml sampel protein ditambah 1 ml reagen bradford dan divortek, kemudian dibiarkan selama 5 menit dan diamati pada 595 nm.





Gambar 1. Diagram alir purifikasi polifenol oksidase dari kulit buah langsung.

3.3.4 Karakterisasi Polifenol Oksidase

3.3.4.1 Afinitas Enzim terhadap Substrat

Afinitas enzim terhadap substrat diketahui melalui penentuan nilai K_m dan V_{maks} . Nilai K_m dan V_{maks} masing-masing substrat (konsentrasi 0,25 - 2,75 mM) dicari dengan jalan mereaksikan enzim dengan substrat dan memplotkan data $1/(S)$ vs $1/V$ sesuai dengan metode Lineweaver-Burk (Whitaker, 1972).

3.3.4.2 Pengaruh Zat Penghambat

Untuk mengetahui pengaruh zat penghambat pada aktivitas polifenol oksidase, enzim hasil purifikasi diinkubasi dengan masing-masing inhibitor (konsentrasi akhir 0,05 - 3,5 mM) selama 5 menit pada suhu 25°C . Residu aktivitas polifenol oksidase diukur di bawah kondisi uji standar.

3.3.5 Elektroforesis (SDS PAGE)

Formula pembuatan gel adalah 12,5% resolving gel dan 4,5% stacking gel. Sampel didenaturasi dengan pemanasan pada air mendidih selama 3 menit dengan penambahan 2% SDS dan 5% β -merkaptoetanol. Elektroforesis dilakukan pada tegangan tetap yaitu 100 V. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan larutan Coomassie Brilliant Blue R-250 (*staining solution*) dan dicuci dengan *destaining solution*.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Purifikasi Parsial Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung

4.1.1 Ekstraksi dan Presipitasi

Enzim diekstraksi dari kulit buah langsung beku (300 gr) dengan menggunakan blender alumunium pada kondisi suhu dibawah 4°C kemudian ekstrak kasar dipresipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 – 80%).

Tahapan purifikasi polifenol oksidase dari kulit buah langsung menghasilkan polifenol oksidase dengan tingkat aktivitas seperti terlihat pada Tabel 2. Ekstrak kasar polifenol oksidase yang diperoleh dari sentrifugasi 4000 rpm (I) mempunyai aktivitas total 24375850,8 kU dan aktivitas spesifik 5744,82 kU/mg protein. Presipitasi ekstrak kasar dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 – 80%) akan meningkatkan kemurnian polifenol oksidase sebesar 25,57 kali dengan hasil yang cukup tinggi yaitu 77,29% dari total polifenol oksidase terekstrak dibandingkan dengan hasil penelitian polifenol oksidase kulit buah langsung yang dilakukan sebelumnya, yaitu kelipatan pemurnian 2,2 kali dengan hasil 37,33% dari total polifenol oksidase terekstrak (Rahayu, 1998). Hasil yang lebih tinggi ini diperkirakan terjadi karena metode ekstraksi yang dilakukan lebih modern yaitu dengan blender alumunium dan penggunaan homogenizer sedangkan dalam penelitian terdahulu ekstraksi dilakukan secara manual yaitu menggunakan mortal-stumper. Penggunaan blender alumunium ini akan mempersingkat waktu ekstraksi sehingga tingkat pencoklatan yang terjadi lebih rendah, selain itu tingkat penghancuran jaringan kulit buah langsung yang tinggi dengan penggunaan homogenizer akan meningkatkan jumlah enzim yang diperoleh.

4.1.2 Kromatografi Kolom Sepacryl

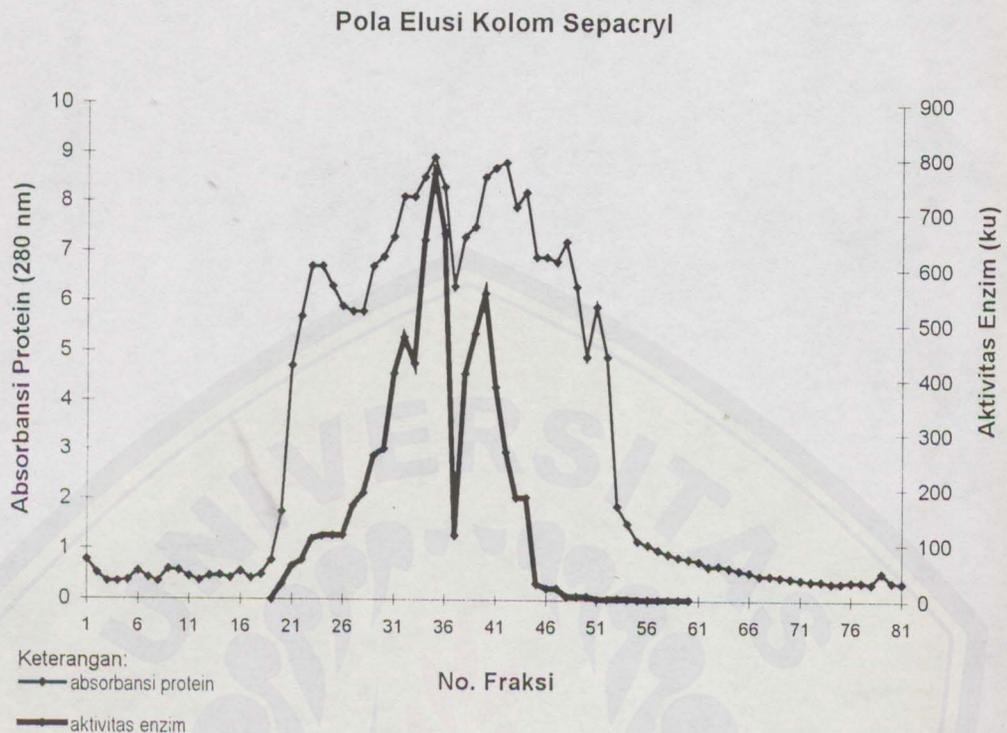
Ekstrak enzim yang telah dipresipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 – 80%) selanjutnya dilewatkan pada kolom *sepacryl*. Elusi dari kolom *sepacryl* ini masing-masing diamati kandungan proteinnya pada panjang gelombang 280 nm dan

ditentukan aktivitas enzimnya (Gambar 2). Pola elusi aktivitas polifenol oksidase pada kolom *sepacryl* menampakkan dua puncak dengan aktivitas enzim. Puncak pertama terjadi pada fraksi 30 – 36 dan puncak kedua pada fraksi 38 – 42. Selanjutnya puncak pertama dan kedua ini dikumpulkan secara terpisah dan disebut sebagai polifenol oksidase I dan II yang kemudian digunakan dalam karakterisasi polifenol oksidase.

Polifenol oksidase I memiliki aktivitas spesifik sebesar 188069,27 kU/mg protein dengan kelipatan pemurnian 32,74 kali dan hasil 22,14% sedangkan aktivitas spesifik polifenol oksidase II sebesar 458978,095 kU/mg protein, kelipatan pemurnian 79,89 kali dan hasil yang sedikit lebih kecil yaitu 19,77% dari ekstrak kasarnya (Tabel 2).

Tabel 2. Karakter Purifikasi Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung

Tahap Purifikasi	Total Aktivitas (kU)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (kU/mg)	Kelipatan Pemurnian	Hasil (%)
Ekstrak kasar	24375850,8	4243,1	5744,82	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30 – 80%)	18975900	128,25	146907,60	25,57	77,29
Sepacryl					
- polifenol oksidase I	5397588	28,7	188069,27	32,74	22,14
- polifenol oksidase II	4812270	10,5	458978,095	79,89	19,77

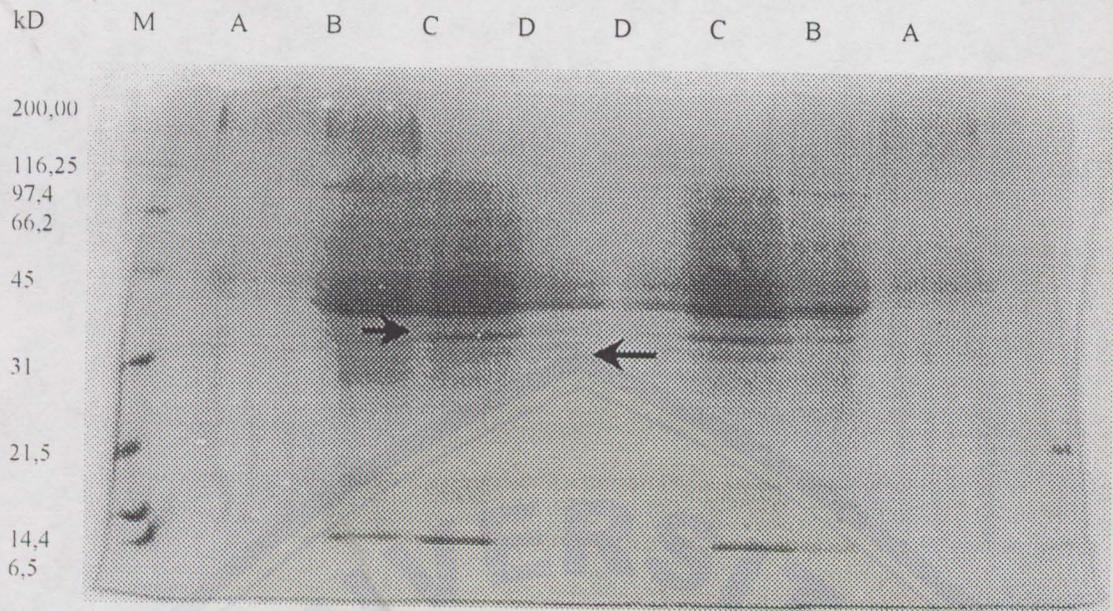


Gambar 2. Pola elusi aktivitas polifenol oksidase pada kolom sepacryl

4.1.3 Elektroforesis (SDS-PAGE)

Homogenitas dan kemurnian enzim hasil purifikasi diketahui melalui analisa elektroforesis SDS-PAGE. Gambar 3 menunjukkan hasil SDS-PAGE polifenol oksidase dari kulit buah langsung dimana nampak bahwa berat molekul dari polifenol oksidase I dan II yaitu 31 – 45 kD (tanda panah). Nilai ini mendekati berat molekul polifenol oksidase pada kentang dan tebu (36 kD) dan pada apel yaitu 30 – 40 kD seperti yang dilaporkan oleh Harer *et al.*, (1995).





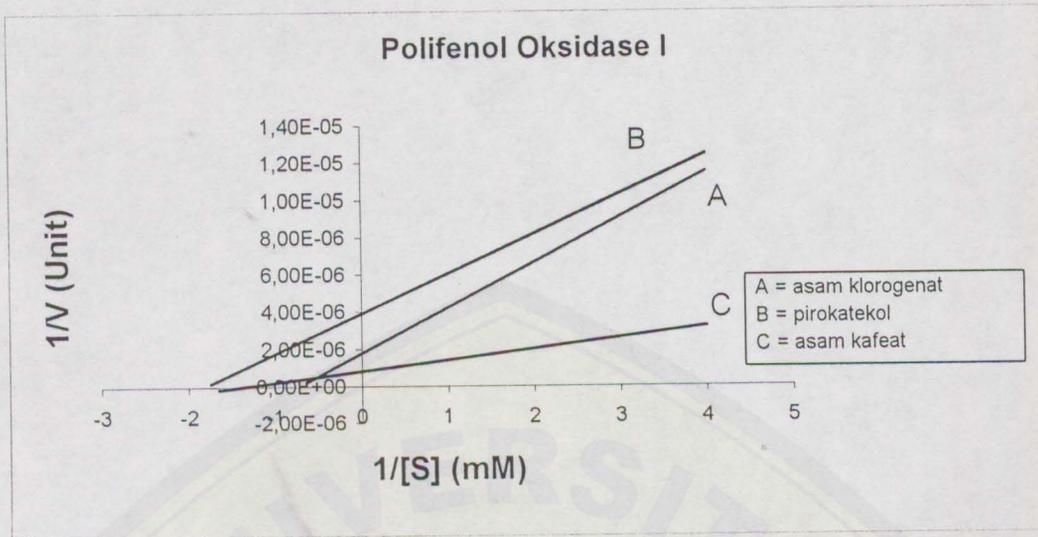
Gambar 3. SDS-PAGE dari polifenol oksidase kulit buah langsung, M (marker), A (ekstrak kasar), B (fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), C (fraksi kolom sepacryl I), D (fraksi kolom sepacryl II). Tanda panah menunjukkan protein polifenol oksidase I dan II.

4.2 Karakterisasi Polifenol Oksidase

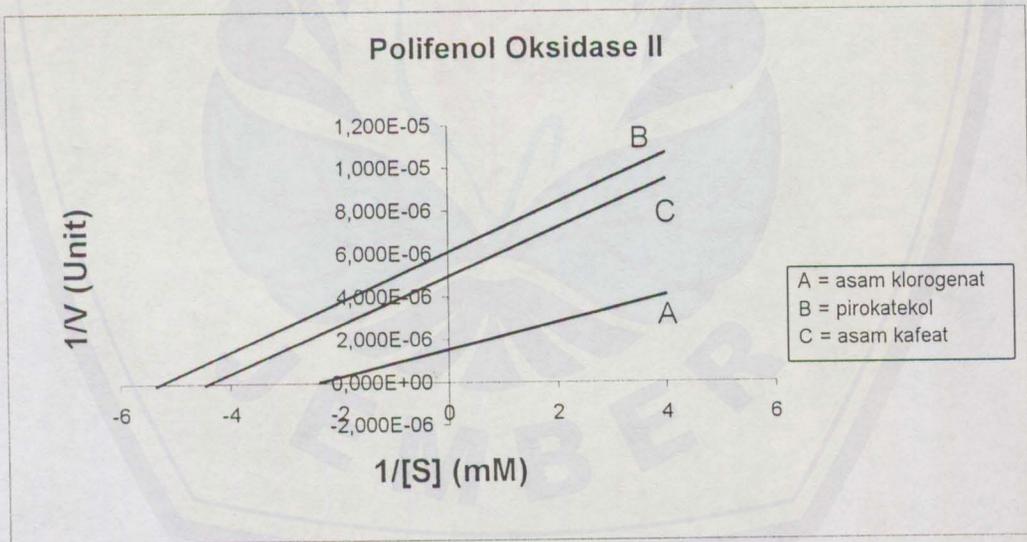
4.2.1 Afinitas Polifenol Oksidase terhadap Substrat

Nilai dari konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan reaksi maksimal (V_{maks}) untuk polifenol oksidase I dan II ditentukan dengan menggunakan lima jenis substrat, yaitu asam klorogenat, pirokatekol, asam kafeat, L-fenilalanin dan p-kresol dengan menggunakan metode Lineweaver-Burk.

Plot data Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase terhadap substrat asam klorogenat, pirokatekol dan asam kafeat ditunjukkan pada Gambar 4 (polifenol oksidase I) dan Gambar 5 (polifenol oksidase II). Pada kedua gambar ini tidak nampak data afinitas polifenol oksidase terhadap substrat L-fenilalanin maupun p-kresol (monofenol) karena polifenol oksidase dari kulit buah langsung ini tidak bereaksi dengan kedua substrat tersebut.



Gambar 4. Plot Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase I dengan menggunakan berbagai substrat.



Gambar 5. Plot Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase II dengan menggunakan berbagai substrat.

Nilai dari konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}) dari polifenol oksidase I dan II terhadap berbagai substrat yang ditambahkan nampak pada Tabel 3 dimana asam klorogenat, pirokatekol dan asam kafeat dioksidasi secara nyata oleh polifenol oksidase I maupun polifenol oksidase

II dan tidak ada aktivitas enzim yang nampak terhadap substrat L-fenilalanin dan p-kresol (monofenol).

Tabel 3. Substrat Spesifik dan Data Kinetik Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung

Substrat	Polifenol Oksidase I		Polifenol Oksidase II	
	Km (mM)	Vmaks (U)	Km (mM)	Vmaks (U)
Asam Klorogenat	1,406	577367,206	0,424	666222,518
Pirokatekol	0,551	257731,959	0,190	164798,945
Asam Kafeat	0,746	1264222,503	0,228	202798,621
L-fenilalanin	-	-	-	-
p-kresol	-	-	-	-

Kedua enzim, yaitu polifenol oksidase I dan II dari kulit buah langsung ini mempunyai spesifitas substrat paling tinggi terhadap pirokatekol (nilai Km = 0,551 mM dan 0,190 mM) kemudian diikuti dengan asam kafeat (0,746 mM dan 0,228 mM) dan asam klorogenat dengan afinitas terendah (1,406 mM dan 0,424 mM). Hasil ini berbeda dengan polifenol oksidase yang berasal dari buah loquat yang menunjukkan spesifitas tertinggi terhadap asam klorogenat (Km = 0,105 mM) dibanding terhadap 4-metil katekol, pirokatekol maupun asam kafeat (Ding *et al.*, 1998). Whitaker (1972) melaporkan bahwa afinitas polifenol oksidase dari kentang terhadap asam klorogenat (100%) lebih tinggi daripada katekol (71,4%). Fujita *et al.*, (1991) melaporkan bahwa polifenol oksidase dari selada mempunyai afinitas lebih tinggi pada asam klorogenat dibandingkan terhadap katekol dan methylkatekol. Penelitian yang lain menyebutkan bahwa asam kafeat adalah substrat terbaik (100%) diikuti dengan asam klorogenat (60%) dan pirokatekol (32,5%) bagi polifenol oksidase dari buah blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) (Kader *et al.*, 1997). Namun pada polifenol oksidase dari Malatya apricot, katekol merupakan substrat terbaik (Arslan *et al.*, 1998).

Polifenol oksidase dari kulit buah langsung ini (polifenol oksidase I dan II) tidak menampakkan aktivitas terhadap L-fenilalanin dan p-kresol (monofenol). Hal

ini mengindikasikan bahwa polifenol oksidase I dan II hanya memiliki aktivitas diphenolase dan tidak mempunyai aktivitas monofenolase seperti juga yang terjadi pada polifenol oksidase dari kebanyakan tanaman, misal polifenol oksidase dari buah blueberry (Kader *et al.*, 1997), polifenol oksidase Malatya apricot (Arslan *et al.*, 1998) dan polifenol oksidase dari loquat (Ding *et al.*, 1998).

Pada Tabel 3 tampak bahwa nilai Km polifenol oksidase II terhadap ketiga substrat difenol selalu lebih kecil dibandingkan dengan polifenol oksidase I hal ini menunjukkan bahwa afinitas antara polifenol oksidase II dengan substrat adalah lebih besar. Nilai Vmaks polifenol oksidase I terhadap substrat pirokatekol dan asam kafeat lebih besar dibanding polifenol oksidase II sedangkan untuk substrat asam klorogenat nilainya lebih kecil.

Nilai Km polifenol oksidase I dan II terhadap asam klorogenat masing-masing adalah 1,406 mM dan 0,424 mM. Hasil ini lebih besar jika dibandingkan dengan polifenol oksidase dari loquat yang mempunyai nilai Km 0,105 mM terhadap substrat yang sama (Ding *et al.*, 1998) dan jauh lebih kecil dari nilai Km polifenol oksidase minyak biji kacang 5,71 mM; polifenol oksidase pear 22,7 mM; polifenol oksidase plums 20 mM, polifenol oksidase persik 67 mM dan polifenol oksidase anggur 67 mM, sedangkan nilai Km untuk substrat pirokatekol yaitu 0,551 mM dan 0,190 mM jauh lebih kecil dibandingkan nilai Km polifenol oksidase Malatya apricot terhadap substrat yang sama yaitu 6,6 mM. Untuk substrat asam kafeat nilai Km polifenol oksidase I adalah 0,746 mM dan 0,228 mM untuk polifenol oksidase II.

4.2.2 Pengaruh Senyawa Penghambat

Aktivitas polifenol oksidase dapat dipengaruhi dan dihambat oleh beberapa senyawa kimia. Dalam penelitian ini digunakan lima jenis senyawa penghambat yaitu asam askorbat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, EDTA, resorsinol dan β -merkaptotanol. Penurunan aktivitas katalisa polifenol oksidase dari kulit buah langsung yang disebabkan oleh adanya senyawa penghambat dinyatakan dalam persentase penghambatan. Persentase penghambatan ini ditentukan menggunakan substrat

asam klorogenat, pirokatekol dan asam kafeat dengan empat tingkat variasi konsentrasi masing-masing inhibitor (Tabel 4).

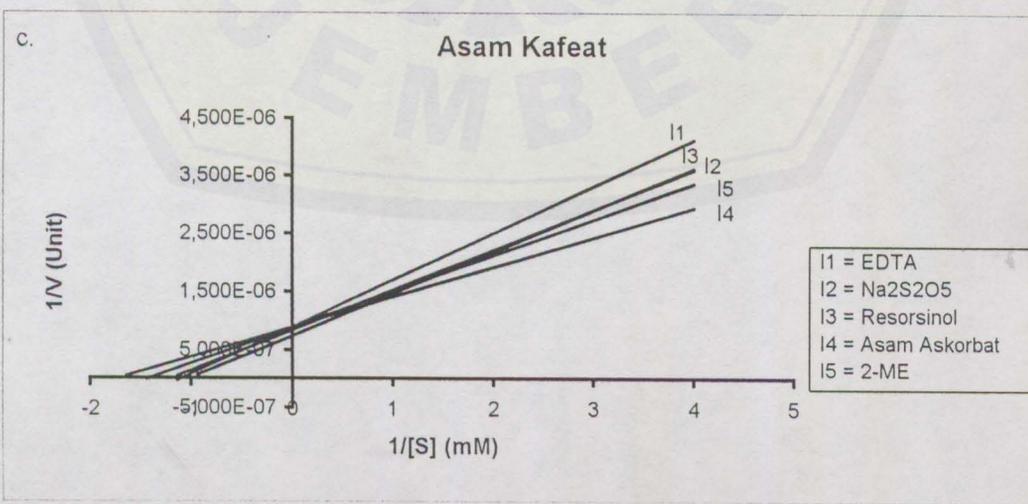
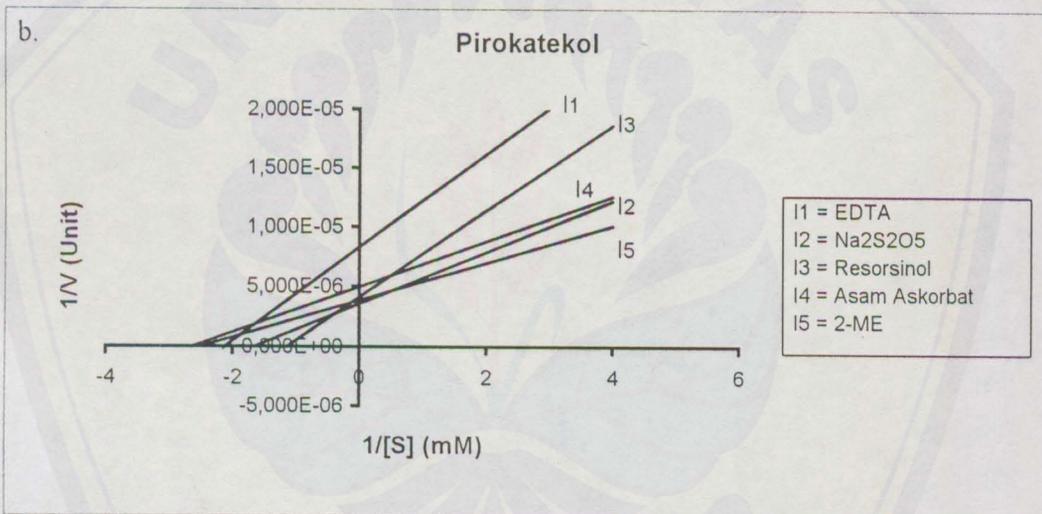
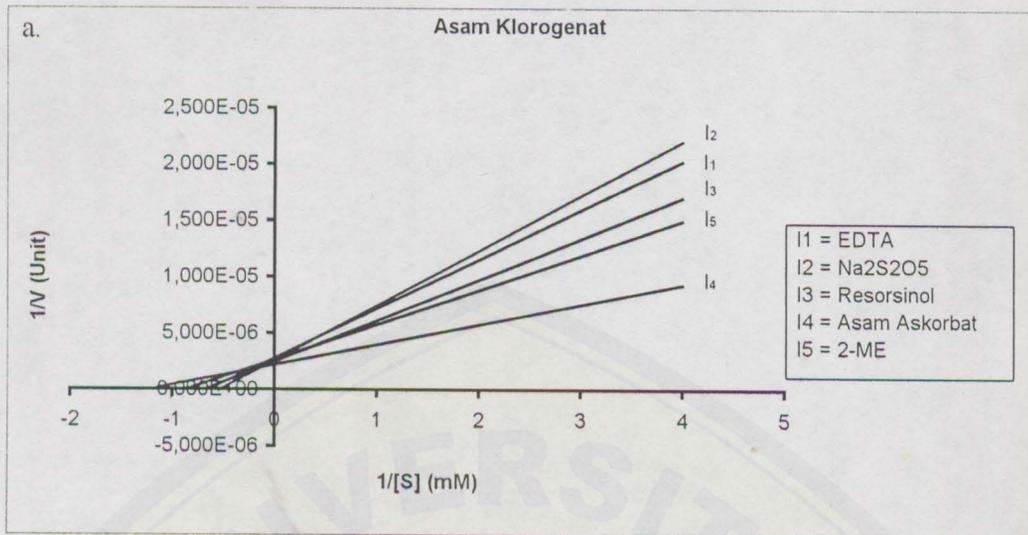
Senyawa penghambat yang efektif digunakan pada polifenol oksidase dari kulit buah langsung ini adalah $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, asam askorbat dan β -merkaptotanol, sedangkan EDTA dan resorsinol merupakan penghambat yang lemah.

Tabel 4. Pengaruh Beberapa Senyawa Penghambat Pada Aktivitas Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsung

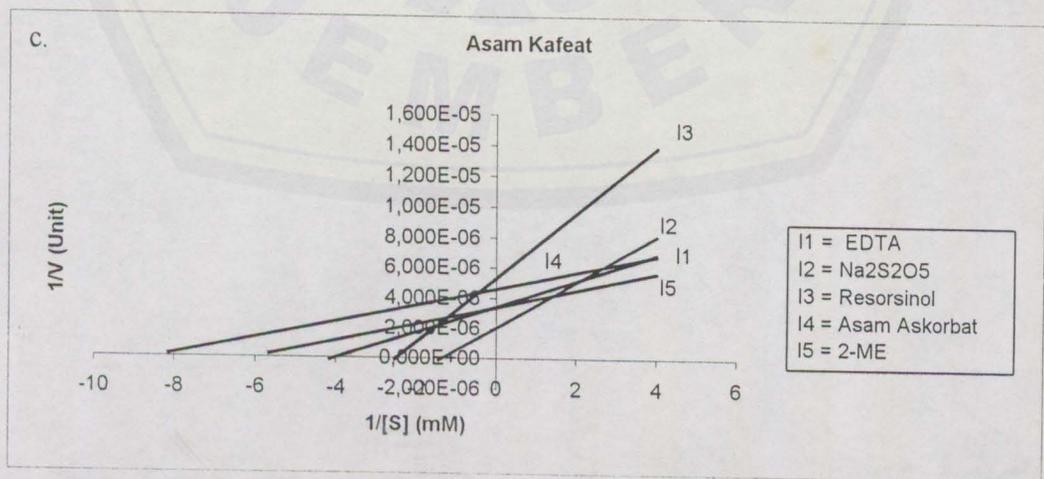
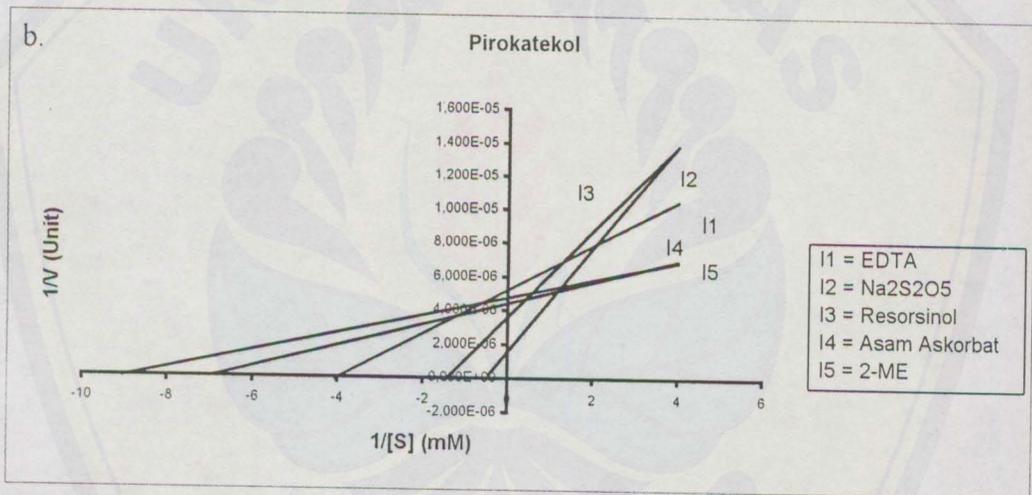
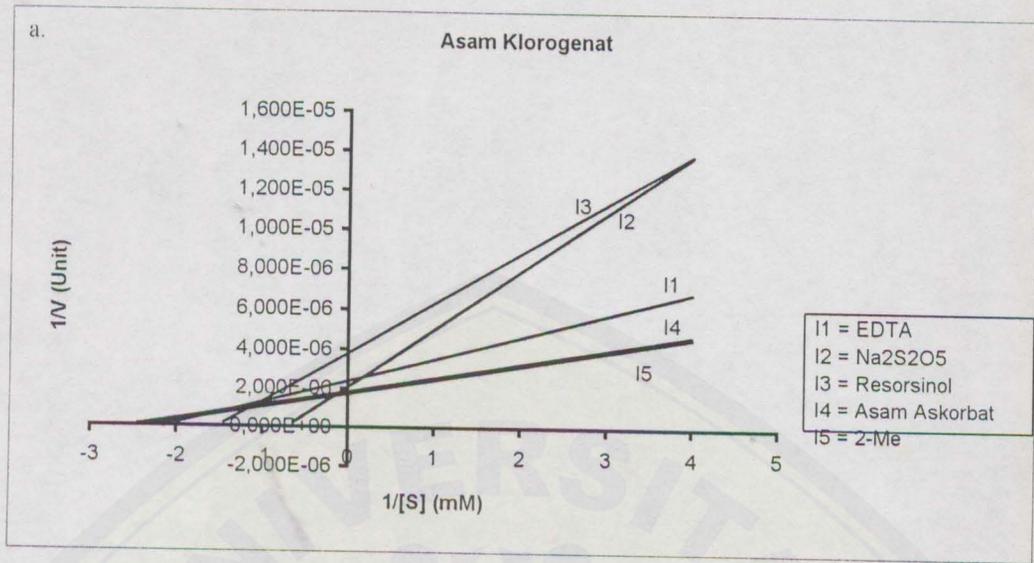
Inhibitor	Konsentrasi (mM)	% Penghambatan					
		Asam Klorogenat		Pirokatekol		Asam Kafeat	
		Polifenol Oksidase					
		I	II	I	II	I	II
Asam askorbat	0,10	45	43	43	40	44	42
	0,25	58,3	54,2	54,2	53	58,3	54,2
	0,50	64	61,9	61,7	59,3	62,7	60
	1,00	91	90	90	89	92	90
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	0,05	41,67	41	41,67	38	41,67	40
	0,10	54,2	53	51	52	52,3	53,3
	0,30	61	60	58,3	58	60	60
	0,50	95	95	90	88	95	94
EDTA	1,50	20	19	19	15	21	18
	2,00	30,8	30	25,8	24,9	30,8	30
	3,00	40,65	42	40,65	41	42	43,3
	3,50	52,3	53	52,94	51	53	52
Resorsinol	1,50	43	42	47,8	47	42,8	43,3
	2,00	50	49,8	49,8	48,3	49,8	49
	2,50	55	55,2	56,5	54,9	55	55,2
	3,00	72	69	65,2	64	71,4	69
β -ME	0,05	43	42,8	40,67	40	41	41,2
	0,10	55	54,8	54,2	53	54,8	54,8
	0,50	62	61,5	60	59,2	61	60
	1,00	89	89	87	85	89	87,5

Penentuan kinetika enzim dengan pengaruh penghambatan dilakukan menggunakan konsentrasi senyawa penghambat yang dapat menyebabkan penghambatan reaksi enzimatik sebesar 50%.

Gambar 6 (a, b, c) dan Gambar 7 (a, b, c) menunjukkan plot data Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase I dan II dengan pengaruh penghambatan.



Gambar 6. Plot Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase I dengan menggunakan berbagai inhibitor.



Gambar 7. Plot Lineweaver-Burk dari polifenol oksidase II dengan menggunakan berbagai inhibitor.

Peningkatan nilai K_m dari polifenol oksidase I dan polifenol oksidase terhadap berbagai substrat yang ditambahkan nampak dengan adanya EDTA, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ dan resorsinol sedangkan saat ditambahkan asam askorbat dan β -merkaptotanol nilai K_m menurun (Tabel 5).

Tabel 5. Data Kinetik (nilai K_m) polifenol oksidase Kulit Buah Langsung dengan Beberapa Inhibitor

Inhibitor	Km (mM)					
	Asam Klorogenat		Pirokatekol		Asam Kafeat	
	Polifenol Oksidase					
	I	II	I	II	I	II
Asam askorbat	0,825	0,395	0,383	0,112	0,589	0,119
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	1,932	1,645	0,887	1,946	0,995	0,748
EDTA	1,575	0,474	0,612	0,251	0,843	0,252
Resorsinol	1,662	0,666	0,742	0,704	0,922	0,403
β -ME	1,174	0,424	0,404	0,146	0,706	0,168

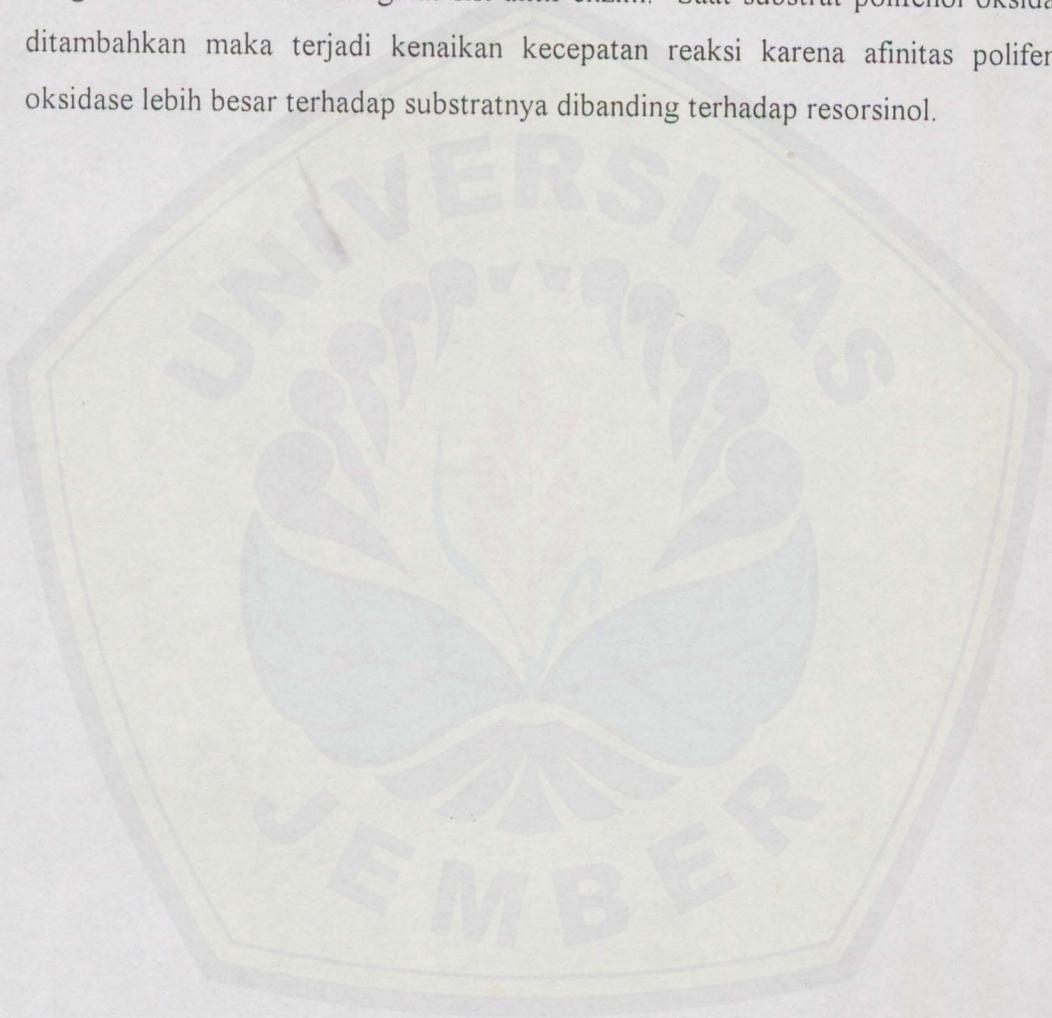
Asam askorbat tidak berikatan dengan enzim bebas atau kompleks enzim substrat. Mekanisme penghambatannya adalah dengan cara mereduksi quinon menjadi bentuk diphenol secepat pembentukannya sedangkan asam askorbat sendiri mengalami oksidasi. Kompleks enzim substrat dapat membentuk produk (quinon) namun quinon akan direduksi kembali menjadi diphenol yang kemudian berikatan dengan enzim dan membentuk kompleks enzim substrat sehingga menyebabkan peningkatan afinitas enzim substrat yang diindikasikan dengan penurunan nilai K_m pada polifenol oksidase I dan II (0,825 mM dan 0,395 mM). Mekanisme penghambatan yang sama terjadi pada β -merkaptotanol dengan nilai K_m 1,174 mM (polifenol oksidase I) dan 0,424 mM (polifenol oksidase II).

Reaksi penghambatan oleh $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ terjadi karena senyawa ini akan berkompetisi dengan substrat untuk menangkap oksigen dan teroksidasi menjadi sulfat.

Reaksi penghambatan oleh EDTA terjadi karena EDTA *chelating agent* yaitu senyawa yang mampu mengikat tembaga (Cu) yang merupakan kofaktor polifenol oksidase sehingga kemampuan enzim untuk menangkap substrat menjadi

berkurang. Namun pada kondisi jumlah enzim dan EDTA yang tetap terjadi kenaikan kecepatan reaksi dengan adanya penambahan substrat.

Mekanisme penghambatan resorsinol terjadi karena gugus fenol yang mirip dengan substrat polifenol oksidase. Enzim akan berinteraksi dengan gugus fenol dari resorsinol tetapi tidak terbentuk produk. Senyawa ini akan berkompetisi dengan substrat untuk mengikat sisi aktif enzim. Saat substrat polifenol oksidase ditambahkan maka terjadi kenaikan kecepatan reaksi karena afinitas polifenol oksidase lebih besar terhadap substratnya dibanding terhadap resorsinol.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Purifikasi polifenol oksidase dari kulit buah langsung menghasilkan dua jenis polifenol oksidase yaitu polifenol oksidase I dan II yang memiliki berat molekul antara 31 – 45 kD. Polifenol oksidase dari kulit buah langsung memiliki afinitas tertinggi terhadap pirokatekol dengan nilai K_m 0,551 mM (polifenol oksidase I); 0,190 mM (polifenol oksidase II) diikuti dengan asam kafeat dan asam klorogenat dengan afinitas terendah.
- b. Asam askorbat, $Na_2S_2O_5$ dan β -merkaptotanol merupakan senyawa penghambat yang efektif untuk polifenol oksidase dari kulit buah langsung.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui persamaan dan perbedaan sifat dari polifenol oksidase I dan II serta kandungan senyawa fenol yang utama pada kulit buah langsung sehingga dapat menambah informasi untuk pengendalian aktivitas enzim ini serta kemungkinan pemanfaatan kulit buah langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson J. W., 1968, **Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissue**, *Phytochemistry*, vol. 7, pp 1973-1980.
- Anderson J. W. and Rowan K.S., 1967, **Extraction of Soluble Leaf Enzymes With Thiol and other Reducing Agents**, *Phytochem.*, vol 6, pp 1047 - 1056, Pergamon Ltd., England.
- Arslan O, Arzu Temur and Israfil Tozlu, 1998, **Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.)**, *J. Agric. Food Chem*, 46, 1239-1241.
- Bio-Rad, 1984, **Bio-Rad Protein Assay**, Bulletin 1069, 2200 Wright Avenue, Richmond, CA 94804.
- Boyer, R. F., 1990, **Modern Experimental Biochemistry**, Addison-Wesley Publishing co.
- Chevalier, T., David de Rigal, Didier Mbeguie - A- Mbeguie , Frederic Gaillard, Florence Richard – Forget and Bernard R. Fils – Lycaon, 1999, **Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase**, *Plant Physiologi*, vol. 119, pp 1261-1269.
- Coseteng M.Y. and C.Y. Lee, 1987, **Changes in Apple Polyphenol Oxidase and Polyphenol Concentration in Relation to Degree of Browning**, *J. Food. Sci.*, 52, 985 – 989.
- Das, J. R., S. G. Bhat and L. R Gowda, 1997, **Purification and Characterization of A Polyphenol Oxidase from Kew Cultivar of Indian Pineappel Fruit**, Dept. of Bichem, & Nutrition, Institues of Myshore, India.
- Ding C. K., Kazuo Chachin, Yoshinori Ueda and Yoshihiro Imahori, 1998, **Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit**, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4144-4149.
- Eskin, N. A. M., 1990, **Biochemistry of Food**, Academic Press, New York.
- Fujita, S., N. B. Sari, M. Maegawa, T. Tetsuka , N. Hayashi and T. Tono, 1995, **Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Cabbage (*Brassica oleracea* L.)**, *J. Agric. Chem.*, 43, 1138-1142.

- Fujita, S., T. Tono and H. Kawahara, 1997, **Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce (*Lactuca sativa*)**, J. Sci. Food Agric., 55, 643-651.
- Harer, E., Mayer, A.M. and Lerner, H.R., 1978, **Phytochemistry**, J.Sci., Food Agric., 21, 542.
- Kader, F., Bernard Rovel, Michel Girardin and Maurice Metche, 1997, **Mechanism Of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum*L)**, J. Sci.Food Agric., 73, 513-516.
- Madero, C.K., 1982, **Purification and Characterization of Phenol Oxidase from Brown Shrimp**, Ph.D. dissertation, Texas, A & M University, College Station.
- Mayer, A.M, 1978, **Polyphenol Oxidase in Plants**, Phytochemistry, vol. 18, pp. 193 – 215.
- Prota, G., 1988, **Progress in The Chemistry of Melanins and Related Metabolites**, Med. Res. Rev., 8, 525 – 556.
- Rahayu, D.S., 1998, **Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Polifenol Oksidase dari Kulit Buah Langsat (*Lansium domesticum*)**, Skripsi.
- Sanchez – Ferrer, A., Ferrer, Roque Bru, Juana Cabanet and Fransisco Garcia – Carmona, 1988, **Characterization of Catecholase and Cresolase Activities of Monastrell Grape Polyphenol Oxidase**, Phytochemistry, vol. 27, No. 2, pp 319 – 321.
- Whitaker, I.R., 1994, **Principles of Enzymologi For The Food Sciences**, Marcel Dekker, Inc., New York.