

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### A. Warna

Analisis pengujian warna dilakukan berdasarkan hasil perhitungan nilai L, a dan b yang menghasilkan nilai *hue* atau kombinasi dari warna hijau, merah dan biru. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pencelupan *fresh-cut* apel Manalagi pada larutan natrium bisulfit konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm selama 5 menit dan 3 menit menunjukkan hasil yang signifikan terhadap warna daging buah potong segar apel Manalagi pada pengamatan hari ke-0, hari ke-3, dan hari ke-9 (Lampiran 3). Adapun rerata hasil uji warna pada semua sampel apel Manalagi disajikan pada tabel 2.

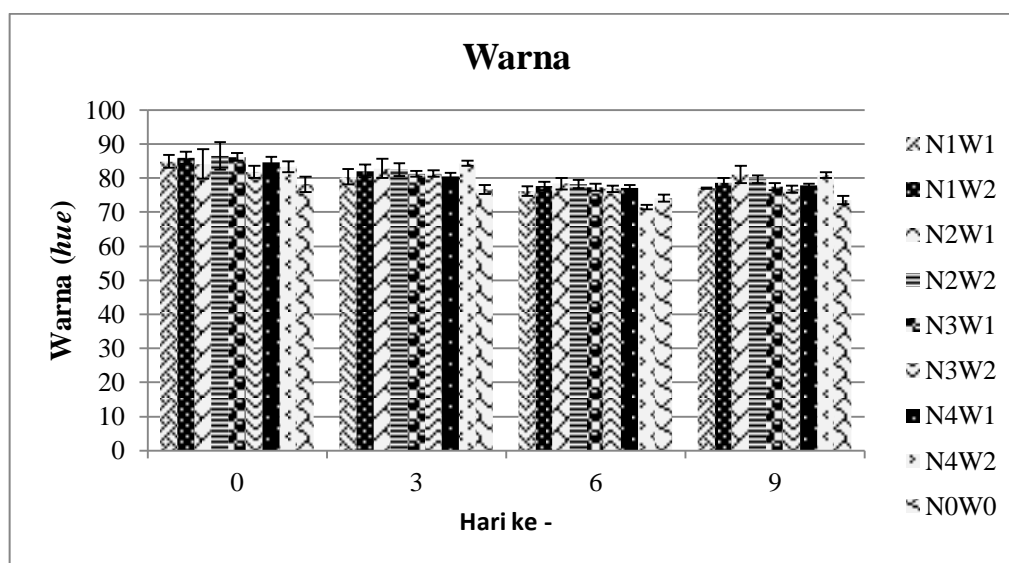
Tabel 1. Rerata hasil uji warna (*Hue*) yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 9 hari pengamatan.

Perlakuan	Kandungan warna ( <i>Hue</i> )			
	Hari ke-			
	0	3	6	9
N1W1	84,92a	80,40b	76,24a	77,06bc
N1W2	86,01a	82,10ab	77,72a	78,69ab
N2W1	84,19a	82,87ab	78,42a	81,05a
N2W2	86,52a	82,56ab	78,30a	79,69ab
N3W1	86,20a	81,21b	77,33a	77,55bc
N3W2	81,83ab	81,30b	76,89a	76,77bc
N4W1	84,65a	80,62b	77,16a	77,86bc
N4W2	83,29a	84,31a	71,50a	80,90a
N0W0	78,21b	76,70c	74,10a	73,57d

Keterangan : angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan DMRT dengan taraf 5%.

N1W1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit

Data pada tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman *fresh-cut* apel Manalagi dengan konsentrasi 50 ppm selama 3 menit menghasilkan rerata nilai *hue* paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya sejak hari ke-0 hingga hari ke-9, dengan kata lain perlakuan tersebut menghasilkan warna daging buah yang lebih cerah secara konstan dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Semakin tinggi nilai *hue* maka semakin tinggi derajat kecerahan daging buah dan sebaliknya. Perubahan warna daging buah potong segar apel Manalagi juga dapat dilihat berdasarkan histogram pada pengamatan hari ke-0 hingga hari ke-9 setelah dilakukan pencelupan pada natrium bisulfit (Gambar 5).



Gambar 1. Histogram hasil uji warna (*Hue*) yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 9 hari pengamatan.

NIWI = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Histogram pada gambar 5 menunjukkan bahwa buah potong segar apel Manalagi mengalami perubahan warna selama penyimpanan. Buah potong segar apel Manalagi yang diberi perlakuan pencelupan natrium bisulfit cenderung mengalami penurunan kecerahan warna daging buah hingga hari ke-6 dan kecerahan warna daging buah meningkat pada hari ke-9. Hal tersebut berbeda halnya dengan buah potong segar apel Manalagi tanpa perendaman yang mengalami penurunan kecerahan warna daging buah sejak hari ke-0 hingga hari ke-9. Secara umum, konsentrasi dan waktu perendaman buah potong segar apel Manalagi dengan natrium bisulfit berpengaruh positif dalam menurunkan laju pencoklatan pada daging buah. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian William *et al.*, (2008) yang menyatakan bahwa tingkat kecerahan daging buah apel potong segar paling tinggi terdapat pada perlakuan menggunakan natrium metabisulfit dan mengindikasikan bahwa perlakuan tersebut merupakan perlakuan yang paling efisien untuk menghambat terjadinya pencoklatan enzimatis. Tan, dkk (2015) menyatakan bahwa reaksi antara sulfit dengan quinon dan perendaman dengan larutan bisulfit efektif dalam menghambat timbulnya warna coklat pada buah dan sayur.

Pada hari ke-9, semua perlakuan pencelupan buah potong segar apel Manalagi pada natrium bisulfit mengalami peningkatan kecerahan warna daging buah, hal ini diduga karena kemampuan senyawa sulfit dalam mereduksi hasil oksidasi quinon menjadi bentuk fenolat sebelumnya yang tidak berwarna. Menurut Kujipers *et al.*, (2012), mekanisme inhibisi pencoklatan oleh senyawa sulfit terbagi menjadi tiga cara, yaitu inhibisi reaksi searah PPO, reduksi o-quinon

sehingga membalikan arah reaksi enzimatik dan pembentukan produk tambahan antara sulfit dan o-quinon sehingga mencegah terjadinya reaksi pencoklatan lebih lanjut. Selain itu, tingkat kecerahan daging buah pada semua perlakuan dihari ke-9 lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa perendaman. Hasil penelitian William *et al.*, (2008) menyatakan bahwa perendaman buah apel potong segar pada larutan yang mengandung sulfit lebih efektif untuk menjaga kecerahan warna alami daging buah dibandingkan dengan perlakuan perendaman pada asam askorbat dan tanpa perlakuan.

Perendaman buah potong segar apel Manalagi pada natrium bisulfit dengan konsentrasi 50 ppm selama 3 menit dan 150 ppm selama 5 menit menghasilkan warna daging buah yang lebih cerah dibandingkan dengan perlakuan lainnya di hari ke-9. Sedangkan perendaman pada natrium bisulfit konsentrasi 200 ppm selama 5 menit menghasilkan warna daging buah paling gelap dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perendaman buah menggunakan natrium bisulfit dapat berpengaruh positif terhadap kecerahan daging buah jika kondisi tersebut cocok dengan kapasitas kejenuhan daging buah, karena residu pada daging buah yang terlalu banyak sebagai akibat dari larutan dengan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat memicu penurunan tingkat kecerahan daging buah (Mohpraman dan Siriphanich, 2012). Residu sulfit merupakan sisa sulfit yang tertinggal dalam suatu bahan pangan. Residu sulfit disebabkan karena adanya perendaman dan sulfit yang larut dalam air masuk ke dalam jaringan buah.

Buah potong segar apel Manalagi tanpa perendaman terus mengalami penurunan kecerahan daging buah sejak hari ke-0 hingga hari ke-9, hal ini

disebabkan karena buah mengalami reaksi pencoklatan terus-menerus sejak hari ke-0 hingga hari ke-9 tanpa adanya senyawa yang menghambat reaksi tersebut. Penelitian William *et al.*, (2008) juga menyatakan bahwa sampel apel potong segar tanpa perlakuan menunjukan kelayuan buah yang cukup signifikan dan reaksi pencoklatan yang sangat jelas sejak hari pertama pengamatan. Menurut Ianou dan Ghoul (2013), pengupasan dan pemotongan buah dapat menyebabkan rusaknya jaringan sel sehingga memicu enzim PPO untuk bereaksi dengan senyawa fenolik yang keluar dari vakuola yang terkoyak akibat pemotongan buah. PPO mengkatalis dua reaksi dengan bantuan oksigen, yaitu hidrosilasi monofenol menjadi o-diphenol dan oksidasi o-diphenol menjadi o-quinon yang disertai dengan polimerisasi non-enzimatik quinon yang menghasilkan melanin pigmen berwarna gelap (Queiroz, 2008). Semakin lama waktu penyimpanan, kecerahan buah potong segar apel Manalagi tanpa perlakuan terus menurun. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan terhadap aktivitas enzim PPO dan kandungan fenol pada sampel yang cenderung meningkat selama waktu penyimpanan. Semakin tinggi kandungan enzim PPO dan fenol dalam buah yang telah diberi perlakuan tambahan seperti pemotongan, maka semakin besar pula kemungkinan terjadinya reaksi pencoklatan enzimatik pada buah.

### **B. Aktivitas Enzim *Polyphenol Oxidase* (PPO)**

Aktivitas enzim PPO diamati menggunakan *spectrophotometer* dengan substrat *pyrocatechol*. PPO mengkatalisis dua reaksi, yaitu hidrosilasi monophenol menjadi diphenol, reaksi ini relatif lambat dan menghasilkan produk yang tidak berwarna. Kemudian terjadi reaksi oksidasi diphenol menjadi quinon

dan reaksi berjalan cepat serta menghasilkan produk yang berwarna (Quieiroz *et al.*, 2008). Rocha dan Morais (2001) menyatakan bahwa aktivitas enzim *polyphenol oksidase* berhubungan erat dengan degradasi perubahan warna pada buah apel. Hasil analisis sidik ragam terhadap kandungan enzim PPO menunjukkan pencelupan buah potong segar apel Manalagi pada larutan natrium bisulfit konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm selama 3 menit dan 5 menit menunjukkan hasil yang signifikan pada pengamatan hari ke-0 hingga hari ke-15 (Lampiran 4). Adapun rerata hasil uji aktivitas enzim PPO disajikan pada tabel 3.

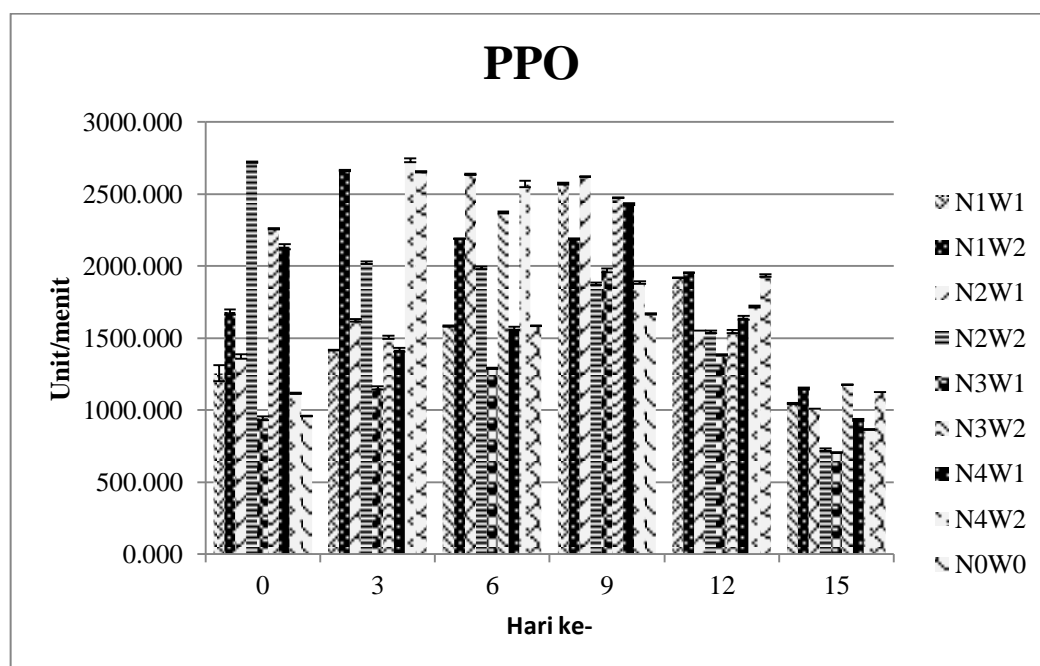
Tabel 2. Rerata hasil uji aktivitas enzim PPO yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

Perlakuan	Kandungan PPO (unit/menit)					
	Hari ke-					
	0	3	6	9	12	15
N1W1	1256,00f	1416,00f	1583,33fg	2571,33b	1917,50c	1045,67d
N1W2	1681,67d	2662,17b	2190,00d	2186,33e	1952,33a	1150,00b
N2W1	1372,33e	1624,00d	2635,67a	2621,00a	1551,33f	1010,67e
N2W2	2720,33a	2022,67c	1985,67e	1877,33g	1543,33f	727,00h
N3W1	944,33h	1153,33g	1290,00h	1971,50f	1384,00g	706,00i
N3W2	2258,33b	1507,33e	2371,33c	2473,00c	1545,78f	1178,33a
N4W1	2135,33c	1419,00f	1568,33g	2427,83d	1642,00e	933,00f
N4W2	1115,33g	2732,67a	2568,56b	1884,67g	1717,67d	866,00g
N0W0	959,33h	2655,33b	1586,00f	1666,33h	1934,67b	1125,50c

Keterangan : angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan DMRT dengan taraf 5%.

N1W1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Perlakuan perendaman pada natrium bisulfit 100 ppm selama 5 menit menunjukkan rerata nilai aktivitas enzim paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya hampir pada setiap pengamatan. Perubahan aktivitas enzim PPO pada buah potong segar apel Manalagi setelah perendaman pada natrum bisulfit juga disajikan dalam histogram pada gambar 6.



Gambar 2. Histogram hasil uji aktivitas enzim PPO yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

NIWI = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Histogram pada gambar 6 menunjukkan aktivitas enzim PPO yang mengalami fluktuasi pada setiap pengamatannya. Aktivitas enzim PPO cenderung mengalami peningkatan pada hari ke-9 kemudian menurun pada hari ke-12 hingga hari ke-15 kecuali pada perlakuan perendaman dalam natrium bisulfit 150 ppm

selama 3 menit. Perendaman buah potong segar apel Manalagi pada natrium bisulfit 150 ppm selama 3 menit menyebabkan penurunan aktivitas enzim PPO sejak pengamatan hari ke-3 hingga hari ke-15.

Penurunan aktivitas enzim PPO disebabkan oleh perendaman buah potong segar apel Manalagi menggunakan natrium bisulfit yang berlangsung efektif untuk menghambat atau menurunkan aktivitas enzim pada konsentrasi tersebut karena senyawa sulfit bersifat racun bagi enzim. Menurut Chandra *et al.*, (2013) penambahan larutan natrium bisulfit sebagai senyawa anti *browning* bekerja dengan cara membentuk ikatan disulfida dengan enzim PPO sehingga menghambat pengikatan dengan oksigen. Ikatan disulfida yang terbentuk menyebabkan penurunan aktivitas enzim tersebut, dengan kata lain penurunan aktivitas enzim PPO disebabkan karena adanya senyawa sulfit yang merupakan racun bagi enzim dengan cara menghambat kinerja enzim esensial. Sulfit akan mereduksi ikatan disulfida pada enzim, sehingga enzim tidak dapat mengkatalis oksidasi senyawa fenolik penyebab pencoklatan (Rianto dalam Ingka 2015).

Yu Shen *et.al.*, (2012) menyatakan bahwa sulfit berkontribusi terhadap pengurangan oksigen sehingga oksidase tidak dapat mengoksidasi konstituen polifenol atau bergabung dengan quinon. Hal tersebut menyebabkan quinon gagal mengalami reaksi dan quinon kembali ke bentuk fenolat sebelumnya (Neo dan Sakino, 2010). Menurut Oktariani (2017), aktivitas enzim PPO sangat bergantung pada konsentrasi oksigen karena oksigen yang akan mengubah senyawa *phenol* menjadi melanin berwarna coklat.



Aktivitas enzim PPO paling rendah di hari ke-15 adalah buah potong segar apel Manalagi yang direndam pada larutan natrium bisulfit 100 ppm selama 5 menit dan tidak berbeda jauh dengan aktivitas enzim PPO pada buah yang direndam pada larutan natrium bisulfit 150 ppm selama 3 menit yang sejak awal pengamatan sudah menunjukkan penurunan aktivitas enzim PPO. Buah potong segar apel Manalagi yang direndam pada larutan natrium bisulfit konsentrasi 100 ppm selama 5 menit menunjukkan aktivitas enzim PPO yang paling rendah hampir disetiap pengamatannya dibandingkan dengan perlakuan lain. Diduga konsentrasi 100 ppm selama 5 menit merupakan konsentrasi terbaik yang memiliki keseimbangan antara konsentrasi larutan natrium bisulfit dengan lama perendaman sehingga mampu menekan aktivitas enzim PPO secara efektif. Freundlich dan Langmuir dalam Atkins (1997) menyatakan bahwa isotherm adsorpsi menunjukkan hubungan kesetimbangan antara konsentrasi adsorbat dalam fluida dan pada permukaan adsorben pada suhu tetap. Kesetimbangan terjadi saat laju pengikatan adsorben terhadap adsorbat sama dengan laju pelepasannya.

Pada hari ke-15, aktivitas enzim PPO masih terus berlangsung namun dalam jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan hari sebelumnya. Menurut Rahman (2007), senyawa sulfite yang terkandung di dalam natrium bisulfit tidak dapat secara mutlak menghentikan reaksi pencoklatan tetapi hanya mampu memperlambat reaksi pencoklatan dengan cara menurunkan aktivitas enzim PPO. Senyawa sulfite menghambat pembentukan pigmen berwarna coklat dengan

mengubah o-kuinon menjadi sulfo-fenolat yang tidak berwarna dan penghambatan terjadi tergantung dari aktivitas tirosinase (Kujiperss *et al.*, 2012).

### C. Aktivitas Enzim Peroksidase (POD)

Enzim peroksidase merupakan salah satu enzim termostabil yang terlibat dalam aktivitas oksidasi elektron tunggal pada berbagai macam senyawa dengan adanya hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Prontipa *et al.*, 2010). Enzim peroksidase menggunakan hidrogen peroksida atau oksigen bebas untuk mengoksidasi suatu variasi yang lebih luas dari penerima hidrogen. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pencelupan buah potong segar apel Manalagi pada Natrium bisulfit dengan konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm selama 5 menit dan 3 menit menunjukkan hasil yang signifikan pada pengamatan hari ke-0 hingga hari ke-15 (Lampiran 5). Adapun rerata hasil uji aktivitas enzim POD disajikan pada tabel 4.

Tabel 3. Rerata hasil uji aktivitas enzim POD yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

Perlakuan	Kandungan POD (unit/menit)					
	Hari ke-					
	0	3	6	9	12	15
N1W1	25,77d	35,68b	29,68d	36,09d	42,09a	46,41b
N1W2	25,57d	39,80a	32,53c	26,15g	32,31d	30,43e
N2W1	19,82f	19,18g	33,80a	28,53e	34,53c	26,28f
N2W2	27,33c	26,59d	20,50h	24,60h	24,33g	22,65g
N3W1	22,27e	11,66h	20,19h	18,43i	22,49h	19,27h
N3W2	28,52b	19,08g	33,30b	46,50a	30,91e	58,42a
N4W1	28,40b	20,63f	24,65g	27,13f	29,89f	35,23d
N4W2	34,45a	31,62c	26,32e	38,23c	37,00b	39,43c
N0W0	19,25g	25,09e	25,16f	40,27b	29,58f	35,45d

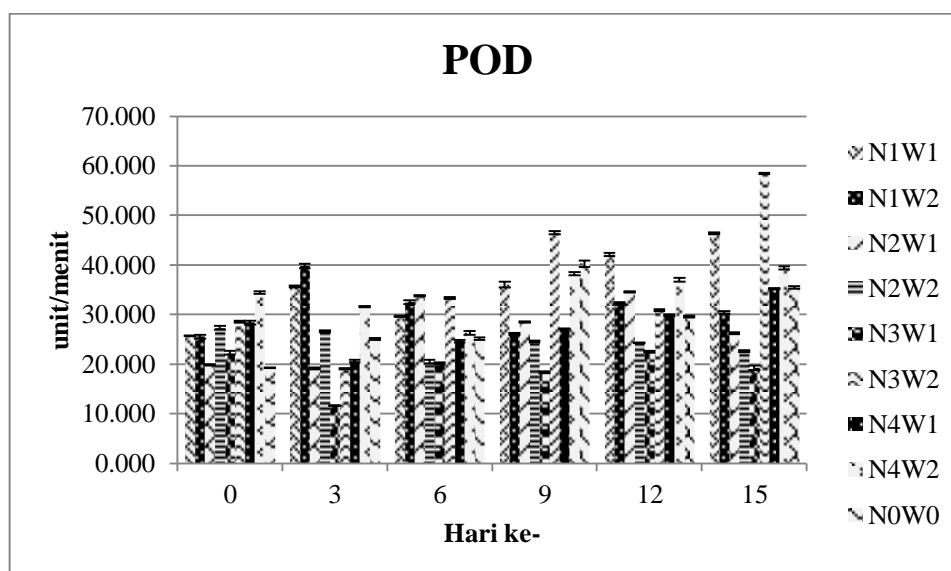
Keterangan : angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan DMRT dengan taraf 5%.

N1W1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Berasarkan data pada tabel 4, buah potong segar apel Manalagi yang direndam pada natrium bisulfit konsentrasi 100 ppm selama 5 menit mengalami rerata aktivitas enzim POD paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya sejak pengamatan hari ke-3 hingga hari ke-15. Meskipun mengalami fluktuasi aktivitas enzim, namun sampel pada perlakuan tersebut menunjukan aktivitas enzim POD paling rendah hingga hari terakhir penyimpanan dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Adapun aktivitas enzim POD disajikan dengan histogram pada gambar 7.



Gambar 3. Histogram hasil uji aktivitas enzim POD yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

NIW1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Buah potong segar apel Manalagi yang direndam pada perlakuan natrium bisulfit konsentrasi 100 ppm selama 5 menit merupakan perlakuan yang mampu diserap oleh jaringan buah dengan optimal sehingga senyawa sulfit berkerja di dalam jaringan untuk menghambat aktivitas enzim yang dibuktikan dengan kadar aktivitas enzim yang paling rendah pada sampel tersebut dibandingkan dengan sampel dengan perlakuan lainnya. Enzim peroksidase yang terdapat pada buah dan sayur merupakan enzim golongan feriprotoporfirin (protohemin) sebagai gugus prostetik, yaitu enzim yang mengandung unsur Fe dan akan berwarna coklat jika dimurnikan. Ikatan antara gugus prostetik yang mengandung besi dan protein dapat distabilkan dengan bisulfit (Embs dan Markakis 1968 dalam deMan 1997). Senyawa sulfit membentuk kompleks dengan besi peroksidase yang dapat menstabilkan atau bahkan menurunkan aktivitas enzim tersebut sehingga reaksi pencoklatan pada buah dapat dihambat. Terefe *et al* (2014) menyatakan bahwa terdapat korelasi antara perubahan warna kecoklatan pada buah selama penyimpanan dengan adanya peningkatan aktivitas enzim POD. Enzim peroksidase merupakan kelompok enzim oksidoreduktase yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi oleh hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dari sejumlah substrat yang merupakan donor hidrogen seperti fenol. Enzim peroksidase dalam organisme hidup dapat mengkatalisis senyawa substratnya, sedangkan  $H_2O_2$  berfungsi untuk menginisiasi biosintesis beberapa metabolit sekunder yang diperlukan pada proses pertumbuhan. Oksidasi fenolat oleh enzim peroksidase

dengan substrat  $H_2O_2$  menghasilkan reaksi kopling oksidatif, sehingga terbentuklah polimer fenolik. Oksidasi yang dilakukan oleh enzim peroksidase terhadap senyawa fenolik menyebabkan terbentuknya suatu radikal fenoksi, dimana radikal ini mampu melakukan resonansi dengan posisi *orto* dan *para* pada cincin aromatiknya dan selanjutnya akan bergabung dengan radikal fenoksi yang lain membentuk senyawa baru polifenol.

Selain pengaruh ikatan antara senyawa sulfit dengan enzim, penurunan aktivitas enzim ini berhubungan langsung dengan ketersediaan substrat, yaitu senyawa fenol karena ketersediaan substrat berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Menurut hasil penelitian Zufahair dan Santi (2008), ketika konsentrasi substrat kecil maka kecepatan reaksi enzim kecil dan saat konsentrasi substrat besar maka semakin banyak substrat yang berhubungan dengan sisi aktif enzim. Meskipun kandungan total *phenol* pada beberapa sampel (Gambar 8) berbanding terbalik dengan aktivitas enzim POD namun hal tersebut tidak mengindikasikan bahwa tidak ada korelasi antara aktivitas enzim POD dengan total *phenol*, karena jenis substrat merupakan komponen inti yang mempengaruhi aktivitas enzim tersebut. Diduga jenis substrat spesifik untuk enzim POD ketersediaannya dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan substrat lainnya. Menurut Gardjito (2014), enzim memiliki spesifitas enzim, yaitu kemampuan suatu enzim untuk membedakan substratnya berdasarkan perbedaan afinitas substrat-substratnya untuk dapat mengaktifkan enzim.

### D. Total Fenol

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pencelupan buah potong segar apel Manalagi pada natrium bisulfit dengan konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm selama 5 menit dan 3 menit menunjukkan hasil yang signifikan pada pengamatan hari ke-0 hingga hari ke-15 (Lampiran 6). Total fenol pada buah potong segar apel Manalagi yang diberi perlakuan perendaman natrium bisulfit menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan tanpa perendaman. Perlakuan perendaman pada natrium bisulfit 100 ppm selama 5 menit menunjukkan total fenol paling rendah diakhir pengamatan dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Tabel 4. Rerata hasil uji total fenol yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi Natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

Perlakuan	Kadar fenol (ppm)					
	Hari ke-					
	0	3	6	9	12	15
N1W1	1201,75e	1566,89g	2131,58d	1026,32d	1984,65bc	945,18f
N1W2	1230,26e	1912,28e	1961,62f	1072,37c	1866,23d	1947,37b
N2W1	673,25h	1717,11f	2117,32d	1031,07d	2379,39a	1217,11d
N2W2	1131,58f	2291,67c	3103,80a	1828,95a	2048,25b	1135,96e
N3W1	1026,32g	2923,25a	2391,45c	1059,94cd	1658,99e	776,32g
N3W2	1519,74c	2070,18d	2531,80b	1402,41b	1890,35d	2239,04a
N4W1	1418,86d	1532,89g	1798,25g	938,60e	1910,09cd	1989,04b
N4W2	1600,88b	1535,09g	1938,96f	787,28f	1356,36f	1271,93c
N0W0	1913,74a	2642,54b	1989,04e	937,50e	1268,64f	1208,33d

Keterangan : angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan DMRT dengan taraf 5%.

NIWI = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit

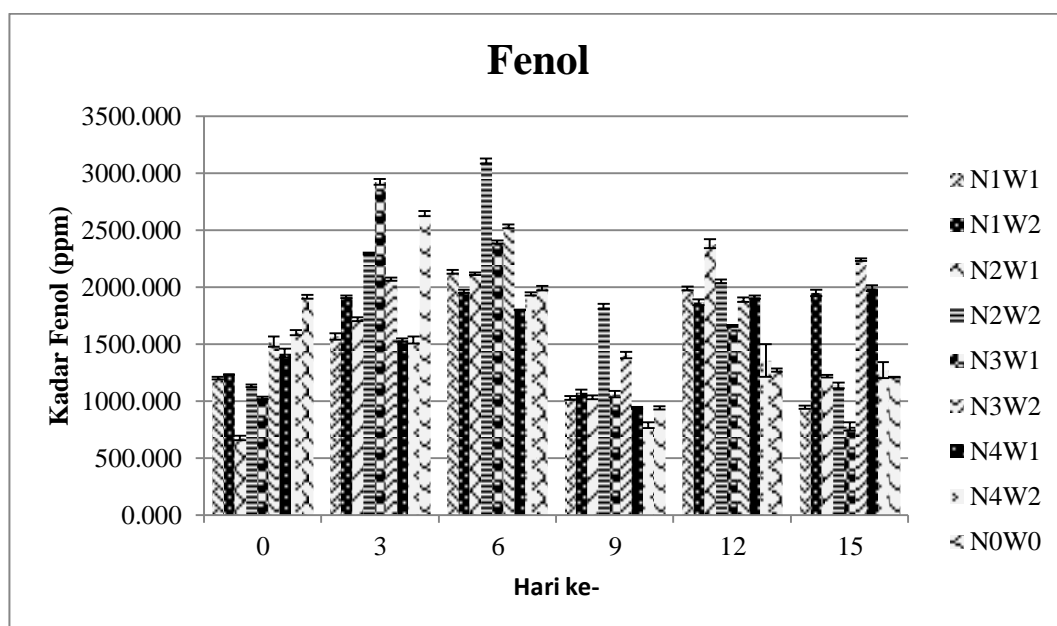
N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Pada hari ke-0, perendaman buah potong segar apel Manalagi pada berbagai konsentrasi natrium bisulfit selama 3 menit dan 5 menit menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap total fenol. Hal ini diduga karena tingkat kematangan buah yang berbeda-beda sehingga mempengaruhi kadar NO dalam buah, kadar NO yang tinggi dalam buah akan menekan peningkatan total fenol dalam buah. Menurut Hyang *et al.*, (2008), tingkat konsentrasi NO pada buah berbeda-beda tergantung pada kematangan buah. Buah yang masih mentah mengandung sekitar 10 sampai 40 kali lebih tinggi kadungan NO dibandingkan dengan buah yang sudah masak. Adapun dinamika perubahan total fenol pada semua perlakuan disajikan dengan histogram pada gambar 8.



Gambar 4. Histogram hasil uji kandungan fenol yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

NIWI = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Histogram pada gambar 8 menunjukkan bahwa kandungan fenol pada semua perlakuan cenderung meningkat pada hari ke-3 dan hari ke-6 kemudian menurun pada hari ke-9. Peningkatan kandungan fenol hingga hari ke-6 berkaitan dengan adanya enzim *phenylalanine-ammonia lyase* (PAL) yang juga meningkat akibat adanya pelukaan. Fenomena total fenol mencapai puncaknya dan kemudian menurun dihari berikutnya terjadi setelah sebelumnya enzim PAL mencapai puncaknya akibat adanya pelukaan. Total fenol tidak secara paralel meningkat bersamaan dengan enzim PAL, melainkan terdapat jeda waktu total fenol mencapai puncaknya (Kubo *et al.*, 1988). Kandungan fenol kembali meningkat pada hari ke-12 dan cenderung menurun pada hari ke-15. Kandungan fenol paling rendah di akhir pengamatan terdapat pada sampel yang direndam pada perlakuan natrium bisulfit dengan konsentrasi 100 ppm selama 5 menit.

Penurunan dan peningkatan kandungan fenol ini berkaitan dengan aktivitas enzim PPO serta berpengaruh langsung terhadap warna buah potong segar apel Manalagi. Kandungan fenol yang meningkat pada hari ke-3 hingga hari ke-6 berhubungan dengan aktivitas enzim PPO yang diamati pada waktu yang sama dan menunjukkan kecenderungan peningkatan aktivitas enzim (Gambar 6). Hal ini tentu berpengaruh pada kenampakan warna buah potong segar apel Manalagi yang mengalami penurunan derajat kecerahan warna daging buah pada hari ke-3 hingga hari ke-6 (Gambar 5). Pada hari ke-9, kandungan fenol pada semua perlakuan mengalami penurunan. Meskipun pada hari ke-9 aktivitas enzim PPO belum menunjukkan penurunan aktivitas enzim yang signifikan, namun hal



tersebut menyebabkan peningkatan kecerahan warna daging buah potong segar apel Manalagi dihari tersebut (Gambar 5).

Kandungan fenol yang berhubungan langsung dengan tingkat kecerahan warna daging buah disebabkan karena senyawa fenol merupakan substrat bagi enzim PPO yang berperan langsung dalam reaksi pencoklatan enzimatis. Menurut Ianou dan Ghoul (2013), pengupasan dan pemotongan buah dapat menyebabkan rusaknya jaringan sel sehingga memicu enzim PPO untuk bereaksi dengan senyawa fenolik yang keluar dari vakuola yang terkoyak akibat pemotongan buah. PPO mengkatalis dua reaksi dengan bantuan oksigen, yaitu hidroksilasi monofenol menjadi o-diphenol dan oksidasi o-diphenol menjadi o-quinon yang disertai dengan polimerisasi non-enzimatik quinon yang menghasilkan melanin pigmen berwarna gelap (Queiroz, 2008).

Secara umum, perlakuan perendaman buah potong segar apel Manalagi menggunakan natrium bisulfit merupakan proses pencegahan reaksi pencoklatan melalui penurunan aktivitas enzim yang mengkatalisis reaksi tersebut, sehingga senyawa sulfit yang masuk ke dalam jaringan buah tidak secara langsung berpengaruh terhadap kandungan fenol, namun menjadi racun bagi enzim fenolase sehingga terjadi penghambatan reaksi pencoklatan. Menurut Kujipers *et al.*, (2012), mekanisme inhibisi pencoklatan oleh senyawa sulfit terbagi menjadi tiga cara, yaitu inhibisi reaksi searah PPO, reduksi o-quinon sehingga membalikkan arah reaksi enzimatik dan pembentukan produk tambahan antara sulfit dan o-quinon sehingga mencegah terjadinya reaksi pencoklatan lebih lanjut. Hal ini sesuai dengan penelitian Zaky (2018) yang menyatakan bahwa perendaman buah

potong segar apel *Rome Beauty* pada larutan natrium metabisulfit tidak memberikan pengaruh yang jelas terhadap kandungan senyawa fenol pada buah.

### E. *Total Antioxidant Activity (TAA)*

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif seperti senyawa oksigen reaktif yang dapat mempercepat penuaan. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pencelupan buah potong segar apel Manalagi pada larutan natrium bisulfit konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm selama 3 menit dan 5 menit menunjukkan hasil yang signifikan terhadap *Total Antioxidant Activity (TAA)* buah potong segar apel Manalagi pada pengamatan hari ke-0 hingga hari ke-15 (Lampiran 7). Adapun rerata hasil uji TAA pada buah potong segar apel Manalagi yang telah diberi perlakuan perendaman pada natrium bisulfit disajikan pada tabel 6.

Tabel 5. Rerata hasil uji *total antioxidant activity* yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

Perlakuan	Kandungan TAA (%)					
	Hari ke-					
	0	3	6	9	12	15
N1W1	0,71e	0,83bc	0,88a	0,86b	0,80e	0,81d
N1W2	0,80d	0,86a	0,80d	0,80d	0,86c	0,79e
N2W1	0,84b	0,87a	0,80d	0,76e	0,83d	0,86b
N2W2	0,79d	0,84b	0,87a	0,82c	0,89a	0,90a
N3W1	0,87a	0,79d	0,84b	0,87b	0,87b	0,83cd
N3W2	0,82c	0,83bc	0,87a	0,80d	0,83d	0,83c
N4W1	0,83bc	0,82c	0,83bc	0,83c	0,79e	0,84bc
N4W2	0,88a	0,64e	0,88a	0,88a	0,79e	0,78e
N0W0	0,83bc	0,83bc	0,82c	0,82c	0,79e	0,73f

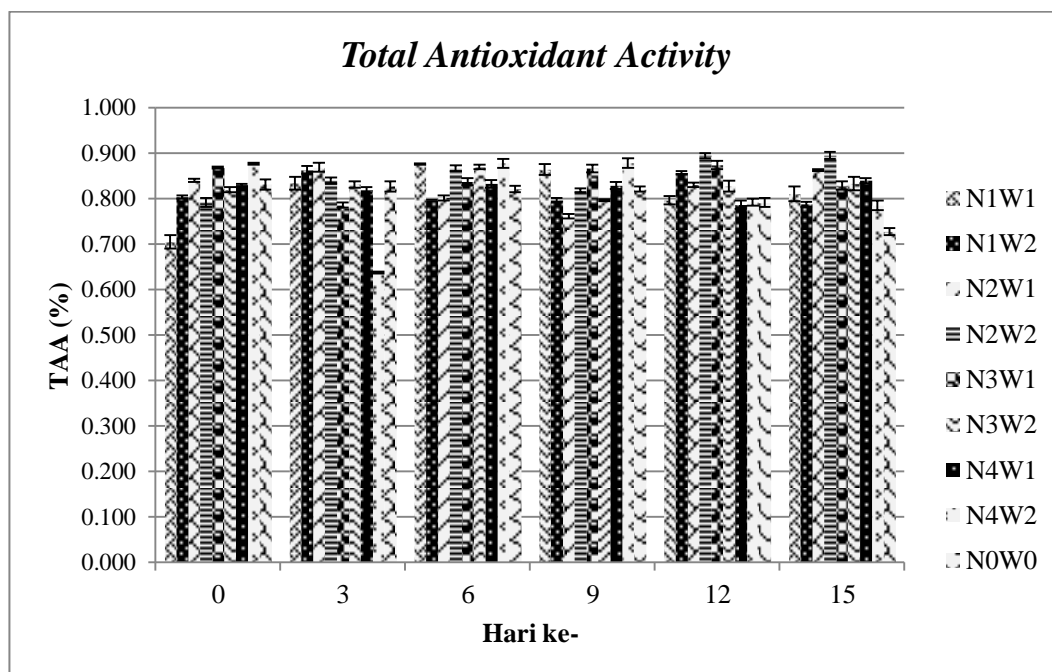
Keterangan : angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan DMRT dengan taraf 5%.

N1W1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit

N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Perlakuan perendaman pada natrium bisulfit 150 ppm selama 3 menit menunjukkan rerata total aktivitas antioksidan paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya dan rerata paling rendah terdapat pada sampel tanpa perendaman. *Total antioxidant activity* (TAA) pada buah potong segar apel Manalagi selama penyimpanan juga dapat dilihat pada histogram yang menunjukkan *trend* TAA sejak hari ke-0 hingga hari ke-15 (Gambar 9).



Gambar 5. Histogram hasil uji TAA yang diberikan perlakuan berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan tanpa perendaman selama 15 hari pengamatan.

NIW1 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N1W2 = Natrium bisulfit 200 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N2W1 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N2W2 = Natrium bisulfit 150 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
 N3W1 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
 N3W2 = Natrium bisulfit 100 ppm + Pencelupan selama 3 menit

N4W1 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 5 menit  
N4W2 = Natrium bisulfit 50 ppm + Pencelupan selama 3 menit  
N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Histogram pada gambar 9 menunjukkan bahwa TAA buah potong segar apel Manalagi pada semua perlakuan perendaman mengalami fluktuasi selama penyimpanan namun cenderung konstan sejak hari ke-3 hingga hari ke-15. Buah potong segar apel Manalagi tanpa perlakuan mengalami aktivitas antioksidan yang terus menurun sejak hari ke-3 hingga hari ke-15. Aktivitas antioksidan pada buah potong segar yang diberi perlakuan perendaman larutan natrium bisulfit cenderung mengalami peningkatan pada hari ke-3 kecuali pada perlakuan pada perendaman natrium bisulfit 50 ppm selama 3 menit yang mengalami penurunan TAA secara drastis namun meningkat lagi pada hari ke-6. Peningkatan aktivitas antioksidan ini berkaitan dengan banyaknya gugus hidroksil pada sampel. Diduga senyawa sulfit yang masuk ke dalam jaringan buah mampu mempertahankan kandungan gugus hidroksil pada senyawa fenol sehingga penangkapan atau penetralan radikal bebas terus berlangsung seperti penetralan spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat menyebabkan kerusakan DNA dan mempercepat penuaan. Menurut Aji (2013), Semakin banyak jumlah gugus hidroksil yang dimiliki oleh senyawa fenol maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Senyawa fenol ini mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan atom hidrogen, sehingga radikal DPPH dapat tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil. Aktivitas peredaman radikal bebas senyawa fenol dipengaruhi oleh jumlah dan posisi hidrogen fenolik dalam molekulnya.

Aktivitas antioksidan pada semua perlakuan cenderung mengalami penurunan pada hari ke-9. Alfianti (2012) menyatakan bahwa kandungan fenolik

dan flavonoid yang tinggi memiliki aktivitas antioksidan penangkapan radikal DPPH yang tinggi pula, begitupun dengan kebalikannya sehingga penurunan aktivitas antioksidan pada hari ke-9 juga dapat dihubungkan dengan menurunnya kadar fenol pada sampel yang sama di hari tersebut (Gambar 8). Wolfe *et al.*, (2003) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan pada apel. Uji kapasitas antioksidan yang dilakukan oleh Lee *et al.*, (2003) menunjukkan urutan senyawaan fenolik menurut kemampuan antioksidannya, yaitu quercetin, epikatekin, prosianidin B2, asam klorogenat dan floretin.

Penurunan aktivitas antioksidan diduga disebabkan oleh proses glikolisis yang terjadi pada sampel selama penyimpanan. Senyawa flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak buah dan berada dalam keadaan tidak murni yang dalam artian berikatan dengan gugus lain merupakan salah satu faktor yang menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan. Senyawa tersebut salah satunya adalah glikosida. Glikosida adalah senyawa yang tersebar luas di dalam tanaman. Glikolisis dapat menurunkan aktivitas antioksidan flavonoid. Hal tersebut mengakibatkan flavonoid tidak dapat mendonasikan hidrogen dan elektron untuk menangkal radikal bebas dikarenakan terjadinya halangan sterik. Adanya perubahan bentuk atom  $-H$  menjadi gugus metil ( $-CH_3$ ) melalui reaksi metilasi juga dapat menurunkan aktivitas antioksidan karena pengurangan atom  $-H$  yang merupakan sumber proton untuk penangkapan radikal bebas (Aji, 2013).