

BIOSINTESIS ETILEN LUKA PADA IRISAN MESOKARP LABU KUNING

-Wound Ethylene Biosynthesis in Wounded Winter Squash Fruit Mesocarp Tissue

Murdijati Gardjito, Mochamad Adnan, Tranggono*

ABSTRACT

The objectives of this study w to obtain new informations to complete the pathway in wounded ethylene biosynthesis and metabolism in the wound tissue of the mesocarp of the winter squash fruit.

The samples were in the term of mesocarp cylinder showing the ratio of wound area and the tissue weight of 4.5 cm²/g and mesocarp disk for the ratio of 15.5 cm²/g respectively.

Experiments in this study were conducted in continuous phase of 44 hours using flowthrough system at 25°C. Analyses and measuremets were done for ethylene, 1 amino cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), malonil-ACC (MACC), HCN, phenolics, 1 amino cyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACC-oxidase), and á cyano alanine sythase (b-CAS) enzymes at certain time interval.

The extent of ethylene production was directly related to the availability of its precursor (ACC) and ethylene-forming enzyme or ACC-oxidase. It was also found that no malonization of ACC occured during biosynthesis of wound ethylene. The result also indicated that the formation of wound ethylene was followed by the formation of cyanide-containing compounds with the similar pattern and an increase in b-CAS activity suggesting cyanide detoxification in the tissue. Larger wound surface area ratio made the b-CAS activity was higher.

Keywords: biosynthesis, wound ethylene, mesocarp 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). Biosintesis etilen luka, ternyata beberapa tahapannya sama dengan biosintesis etilen pada jaringan biasa (Adams & Yang, 1979) yaitu diawali dengan metionin (MET) yang selanjutnya diubah menjadi S-adenosil metionin (SAM). Selanjutnya SAM ini oleh enzim 1-amino siklopropana 1-karboksilat-sintase (ACC-sintase) diubah menjadi asam 1-amino siklopropana 1-karboksilat (ACC) dan akhirnya menjadi etilen karena kerja enzim pembentuk etilen (EFE) atau ACC-oksidase. Hal ini juga didapatkan pada irisan mesokarp labu kuning oleh Hyodo *et al.*, (1983 dan 1985), tetapi apakah semua tahap reaksinya sama, tidak diketahui.

Pada tanaman lain, pembentukan ACC yang tinggi dapat diikuti oleh malonilasi ACC (Yang & Hoffman, 1984), tetapi pada labu kuning yang luka belum diteliti terjadinya malonilasi tersebut. Degradasi enzimatik ACC menjadi etilen pada beberapa macam jaringan tanaman, diikuti oleh pembentukan asam sianofomat yang segera berubah menjadi sianida dan CO₂ (Peiser *et al.*, 1984). Hal yang sama ditemukan oleh

Mizutani *et al.* (1988) pada berbagai macam buah jeruk, apel, *persimmon*, dan lain-lain. Dalam berbagai jaringan terbut, terbentuknya HCN kebanyakan diikuti oleh adanya aktivitas enzim β-sianoalanin sintase (β-CAS) yang mengkatalisis reaksi sistein dan HCN menjadi β-glutamil-b-sianoalanin (Miller & Conn, 1980). Jika dalam jaringan labu kuning terjadi pembentukan HCN, maka perlu diteliti apakah juga terdapat aktivitas detoksifikasi HCN tersebut.

Dengan mengetahui tahap rangkaian reaksi biosintesis (malonilasi) dan metabolisme (pembentukan sianida dan detoksifikasinya) etilen pada jaringan labu kuning yang luka, diharapkan informasi tentang biosintesis dan metabolisme etilen luka menjadi lebih lengkap.

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 Yogya-

* Staff pengajar FTP -- UGM

karta, 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 : asam 1-amino siklopropana 1-karboksilat (ACC), L-sistein, N-N-dimethyl-p-phenylene-diamine, dan NaCN dibeli dari Sigma & Co. dan bahan kimia lain dibeli dari pedagang bahan kimia setempat.

Cara Penelitian

Percobaan 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 diukur pada 30 menit, 3, 10, 20, 25, 30, dan 44 jam setelah pengirisan. Semua pengukuran diulang tiga hingga lima kali.

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 cm²/g dan keping (diameter 9,0 mm dan tebal 2 mm) dengan rasio luas muka dan berat 15,5 cm²/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 dianalisis.

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 analisis

Pengukuran aktivitas enzim ACC-oksidase

Pengukuran aktivitas ACC-oksidase dilakukan dengan jalan menginkubasikan keping mesokarp buah labu segar pada 25 °C dalam 25 ml, larutan ACC 5 mM dalam tabung yang diketahui volumenya. Sebagai pembandingan, inkubasi juga dilakukan pada tabung yang berisi akuades 0,5 ml. Aktivitas ACC-oksidase dihitung berdasarkan produksi etilen yang dihasilkan 1 gram bahan segar per jam pada tabung yang berisi larutan ACC dan yang berisi akuades (Sitrit *et al.*, 1987).

Analisis kandungan ACC

Analisis dilakukan menurut metode Boller *et al.* (1979) dan (Lizada & Yang, 1979). Dalam hal ini dilakukan oksidasi ACC menjadi etilen menggunakan NaOCl dengan katalisator HgCl₂ pada suhu 0°C. Analisis diawali dengan pemberian alkohol 95% pada 2,5 gram bahan yang telah dihaluskan (perbandingan berat bahan:alkohol = 1:2) selama 2,5 menit. Bagian atas (supernatan) diambil sejumlah yang setara dengan 0,1 gram bahan segar kemudian dikeringkan dengan aliran

udara suhu kamar. Ekstrak kering selanjutnya direaksikan dengan NaOCl yang baru dibuat; katalisator HgCl₂ ditambahkan sebanyak 10 tetes dan reaksi dilakukan pada 0°C. ACC dihitung berdasarkan etilen yang dihasilkan dan diukur menggunakan khromatografi gas.

Penentuan MACC

Penentuan MACC dilakukan dengan cara yang sama dengan penentuan ACC, yaitu sampai dengan mendapatkan ekstrak alkohol yang kering, selanjutnya ekstrak diberi 0,5 ml HCl 6 N dan dipanaskan 100°C selama 1 jam agar terhidrolisis. Hidrolisat kemudian dinetralkan dengan NaOH 6 N. ACC dalam ekstrak yang dilarutkan dalam air dan dalam ekstrak yang dihidrolisis dihitung selisihnya (Amrhein & Kionka, 1983).

Penentuan sianida

Penentuan sianida (modifikasi dari Andersen, 1960 dan Cagampang & Rodriques, 1980). Bahan dipotong dan dihaluskan, sebanyak 150 gram, ditetesi H₂SO₄ dalam tabung reaksi yang sesuai, ditambah 3 tetes kloroform. Untuk menangkap CN dipasang pita kertas pikrat selama 24 jam. Setelah itu pita dijenuhkan dengan akuades, ditempatkan pada tabung siring dan disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 2,5 menit. Absorbansi kumpulan ekstrak dibaca pada 1515 nm dan CN ditentukan jumlahnya dengan kurva standar.

Pengukuran aktivitas β-CAS

Ekstraksi enzim β-CAS sesuai dengan metode (Yip & Yang, 1988). Sebanyak 5 gram bahan dipotong, kemudian dihomogenisasi pada 0 °C dengan 12,5 ml 0,1 M buffer Tris-HCl (pH 8,50) lalu disentrifus pada 10.000 G selama 10 menit. Supernatan yang didapat disimpan pada 0 °C untuk penentuan enzim.

Penentuan aktivitas β-CAS dilakukan menurut (modifikasi Miller Conn, 1980, Yip & Yang, 1988). 0,2 ml larutan enzim ditambahkan 0,8 ml buffers Tris HCl (0,1 M pH 8,5), 25 mM L-sistein dan 25 mM NaCN masing-masing 100 mL, kemudian diinkubasi pada 35 °C selama 30 menit. Larutan kemudian ditambah 20 mM N₃-N-N-dimethyl-p-phenylene-diamine dalam 7,2 N HCl dan 20 mM FeCl₃ dalam 1,2 N HCl masing-masing 100 µL. Lalu ditera pada 1 650 nm dan dibandingkan dengan standar Na₂S.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui kaitan antara etilen luka dengan ACC dan ACC-oksidase (dalam reaksi biosintesis) serta sianida dan β-CAS (dalam reaksi metabolisme) pada berbagai luas muka luka mesokarp labu kuning, maka hasil penelitian sebelumnya (Murdijati-Gardjito, 2001) digunakan sebagai pembanding.

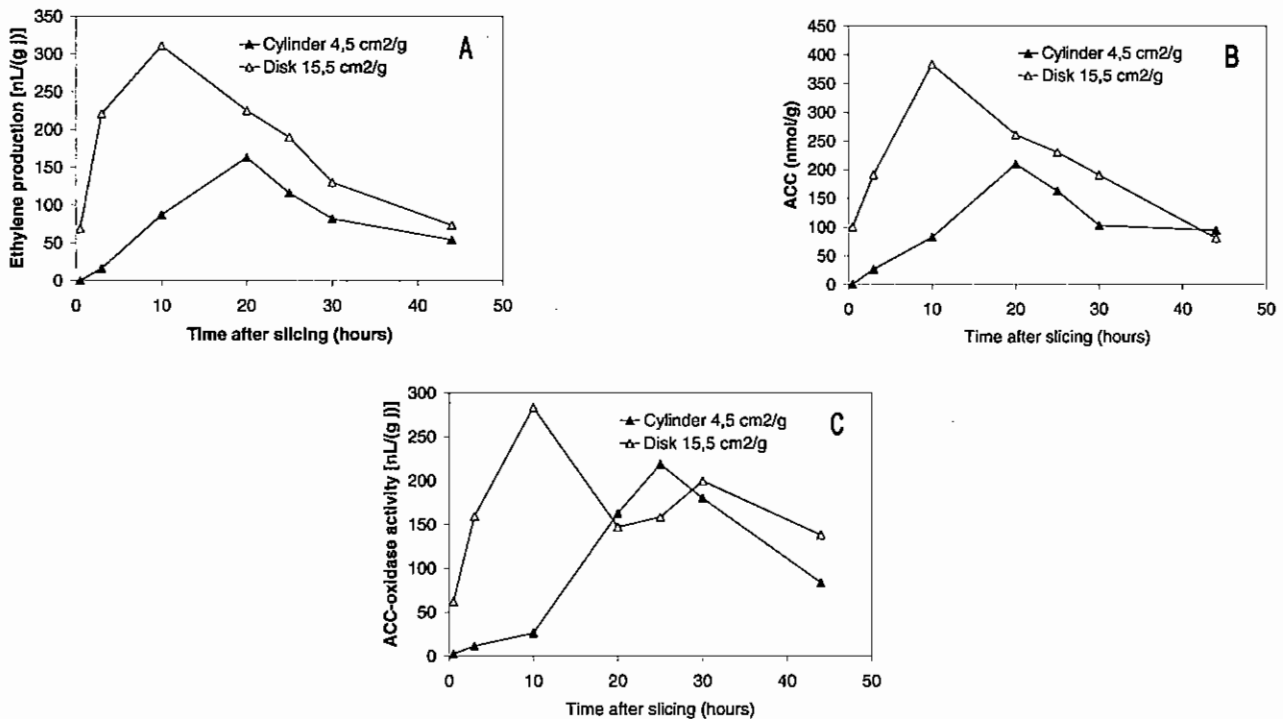


Figure 1.

Ethylene production, ACC, and ACC-oxidase in different wound surface square ratio of the mesocarp winter squash

Etilen Luka, ACC, dan ACC-oksidadase

Dalam bagian ini dikaji kaitan antara etilen dengan ACC dan ACC-oksidadase pada berbagai luas muka luka mesokarp labu kuning. Pada Gambar 1B dapat dikatakan bahwa produksi etilen luka sejalan dengan pembentukan prekursornya untuk kedua macam sampel yang diteliti. Selain itu, puncak produksi etilen luka dan ACC juga lebih tinggi serta lebih cepat tercapai pada rasio luas muka dan berat bahan yang lebih besar. Dengan demikian jika rasio luas muka luka dan berat bahan makin besar, selain terjadi produksi etilen luka lebih besar juga terbentuk prekursor etilen lebih banyak, setidak-tidaknya hingga 30 jam setelah pengirisan.

Pada Gambar 1C dapat dilihat sedikit perbedaan pola aktivitas enzim pembentuk etilen ACC-oksidadase yaitu aktivitas terbesar enzim ACC-oksidadase pada rasio luas muka luka dan berat bahan yang lebih kecil terjadi lebih lambat dibandingkan dengan ACC dan etilennya. Pada rasio yang lebih besar, puncak produksi etilen, kandungan ACC, maupun aktivitas ACC-oksidadase tercapai pada waktu yang bersamaan, yaitu 10 jam setelah pengirisan. Hal ini menunjukkan bahwa pada irisan yang lebih kecil reaksi pembentukan etilen luka lebih cepat, sesuai dengan hasil percobaan sebelumnya.

Etilen luka dan malonilasi

Dalam rangka mengkaji lebih lanjut rangkaian reaksi biosintesis dan metabolisme etilen luka, telah diteliti kemungkinan terjadinya malonilasi pada ACC, seperti yang terjadi pada tanaman gandum (Hoffman *et al.*, 1982) dan tanaman lain (Kawasaki *et al.*, 1982). Percobaan telah dilakukan dan hasil menunjukkan tidak terbentuknya malonyl-ACC (MACC). Dalam hasil analisis didapati bahwa hasil perhitungan atas sampel yang dihidrolisis dan tidak dihidrolisis sesuai dengan cara analisis Amhrein & Kionka (1983), menunjukkan tidak adanya perbedaan. Karenanya, dapat disimpulkan bahwa tidak terbentuk MACC. Pembentukan MACC dalam jaringan telah diketahui merupakan jalur reaksi yang ditempuh jika dalam jaringan terdapat ACC atau produksi etilen yang berlebihan, sehingga dapat menyebabkan ketidakseimbangan fisiologis. MACC merupakan bentuk senyawa yang tidak mempunyai aktivitas biologis, jadi merupakan salah satu cara untuk mencegah terbentuknya etilen berlebihan.

Etilen, senyawa sianida, dan aktivitas β -CAS

Pada bagian ini dicoba untuk mengetahui apakah terjadi pembentukan sianida dalam jalur reaksi pembentukan etilen

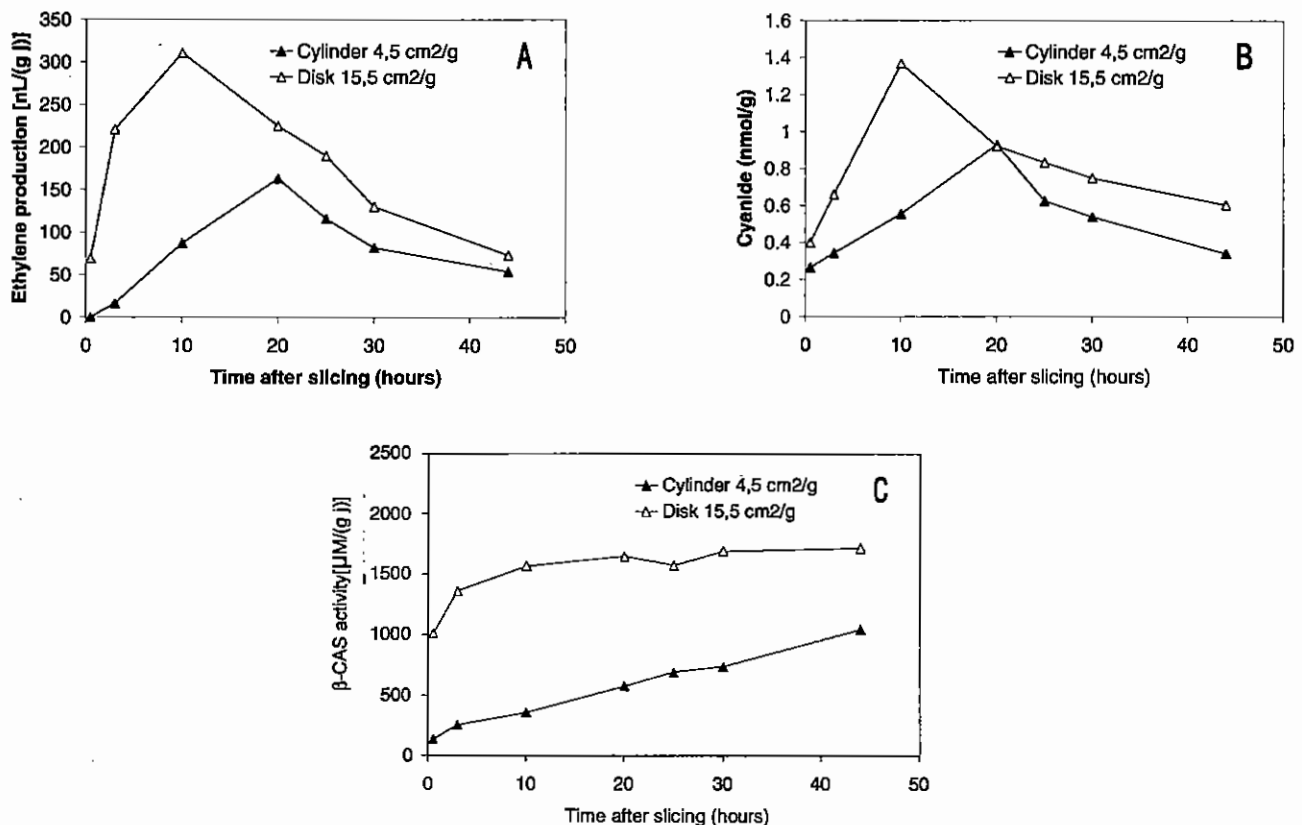


Figure 2.

Ethylene production, Cyanide, and β -CAS content in different wound surface square ratio of the mesocarp winter squash

luka dari ACC. Pada berbagai tanaman tinggi, pembentukan etilen terkait dengan pembentukan sianida (Peiser *et al.*, 1984). Karena sianida dapat mengganggu proses respirasi pada beberapa tanaman (Yip & Yang, 1988) maka penting juga diteliti terdapatnya aktivitas untuk mereaksikan lebih lanjut sianida tersebut, hingga terbentuk sianid alanin yang lebih jauh akan masuk pada rangkaian reaksi asam-asam amino. Untuk ini telah diteliti adanya aktivitas enzim β -CAS. Hasil percobaan ini ditampilkan pada Gambar 2B dan C.

Pada Gambar 2B terlihat bahwa titik tertinggi terbentuknya HCN mengikuti puncak produksi etilen luka. Dalam hal ini dapat dikatakan bahwa produksi HCN pada irisan mesokarp labu kuning sejalan dengan produksi etilen luka. Pada rasio luas muka luka dan berat bahan yang lebih besar, terbentuknya HCN lebih tinggi dan mencapai puncaknya lebih cepat pula seperti etilen luka. Setelah mencapai puncak masing-masing, baik produksi etilen maupun HCN cenderung menurun. Selanjutnya, pada mesokarp labu juga terdapat aktivitas detoksifikasi sianida yaitu adanya aktivitas β -CAS yang cenderung meningkat (Gambar 2C). Pada rasio luas muka luka dan berat bahan yang lebih besar, terjadi peningkatan aktivitas β -CAS yang sangat jelas. Hal ini menunjukkan bahwa produksi etilen luka pada mesokarp labu sangat potensial untuk mempengaruhi proses fisiologi lain sehingga jaringan meningkatkan aktivitas detoksifikasinya melalui kenaikan aktivitas β -CAS.

Dari hasil percobaan ini dapat dikemukakan secara umum bahwa pada rasio luas muka luas dan berat bahan yang lebih besar, pada mesokarp labu kuning terjadi peningkatan pem-

bentukan senyawa dan aktivitas enzim yang terkait dalam pembentukan etilen luka secara lebih cepat dan lebih tinggi. Jika dalam penelitian terdahulu telah dikaji proses biosintesis etilen luka pada mesokarp labu kuning dalam kaitannya dengan aktivitas ACC-sintase (Hyodo *et al.*, 1983), pembentukan ACC serta aktivitas dan peran ACC-oksidas (Hyodo *et al.*, 1985 dan 1993), maka pada penelitian ini telah ditemukan jalur reaksi lanjutannya, yaitu rangkaian reaksi ACC lebih lanjut. Temuan ini dapat melengkapi informasi dalam menjelaskan proses biosintesis dan metabolisme etilen luka pada mesokarp labu kuning.

Secara keseluruhan dari hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa jaringan mesokarp labu kuning tingkatan luka jaringannya sangat mempengaruhi produksi etilen luka yang ternyata didukung oleh pembentukan senyawa prekursor serta enzim yang mengkatalisasi pembentukan etilen luka tersebut. Dalam rangkaian reaksi pembentukan etilen luka, pada jaringan labu kuning ini ternyata tidak terjadi malonilasi ACC, tetapi terbentuk sianida dengan pola yang serupa dengan pembentukan etilen luka. Pembentukan sianida ini diikuti dengan kecenderungan peningkatan aktivitas β -CAS. Makin besar rasio luas muka luka dan berat bahan segar, aktivitas β -CAS makin meningkat karena diperlukan untuk mencegah pengaruh negatif sianida pada proses fisiologi, seperti respirasi misalnya. Jadi, dari hasil penelitian ini diperoleh informasi baru yang melengkapi hasil penelitian sebelumnya, yaitu pada rangkaian reaksi pembentukan etilen luka dalam mesokarp labu kuning terjadi kenaikan produksi etilen luka yang cukup besar, tetapi

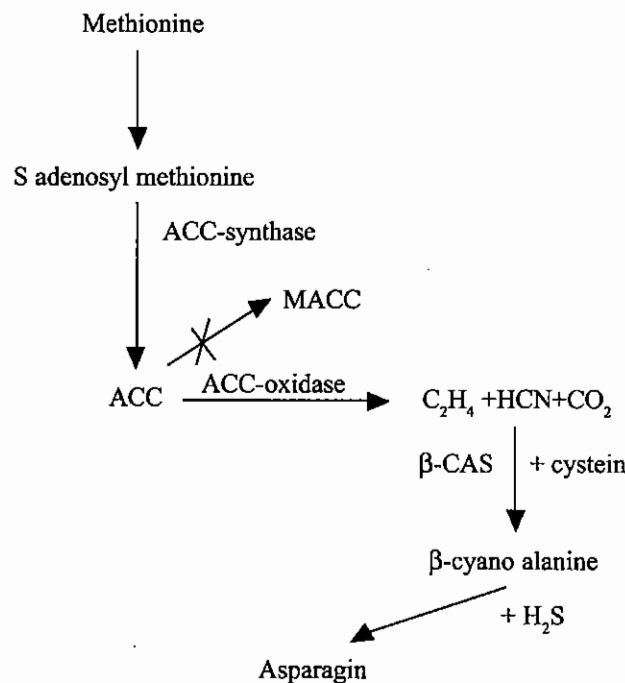


Figure 3. Proposed biosynthetic and metabolism reactions of wound ethylene in mesocarp winter squash

tidak berbahaya untuk proses fisiologi lain. Hal ini terbukti dengan tidak terjadinya pembentukan senyawa MACC sebagai bentuk ACC yang tidak memiliki aktivitas biologis. Bersamaan dengan terbentuknya etilen luka dalam mesokarp labu kuning ini ternyata terbentuk pula HCN yang polanya mirip pola pembentukan etilen luka. Terbentuknya HCN dalam jaringan ini diikuti dengan peningkatan aktivitas β -CAS yang mengkatalisasi reaksi HCN dengan sistein menjadi α -siano alanin dan H_2S . Selanjutnya, β -siano alanin masuk ke dalam rangkaian reaksi asam amino dalam jaringan tersebut.

Dengan demikian skema reaksi yang lebih lengkap dalam metabolisme etilen luka dalam jaringan buah labu kuning dapat disajikan pada Gambar 3. Dalam kaitannya dengan keamanannya sebagai bahan pangan perlu dikemukakan bahwa kandungan sianida yang tertinggi pada irisan yang lebih besar (bentuk silinder) adalah 0,71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dan dalam bentuk yang lebih kecil (keping) 1,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

KESIMPULAN

Pada irisan mesokarp labu kuning yang diteliti didapatkan bahwa, pembentukan prekursor etilen (ACC) dan aktivitas enzim pembentuk etilen (ACC-oksidadase) sesuai dengan pola produksi etilen luka. Dalam biosintesis etilen luka, tidak terjadi malonilasi dari prekursor etilen. Produksi etilen luka diikuti pembentukan sianida dan peningkatan aktivitas β -CAS sebagai mekanisme detoksifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, D.O., & S.F. Yang, 1979. Ethylene Biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane l-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 16, 170-174.
- Amrhein, N. & C. Kionka. 1983. The enzymatic malonylation of l-ACC (Abstract). *Plant Physiology*, 72, Suppl. 31.
- Anderson, L. 1960. *Unpublished Procedure for Precise Estimation of HCN in Sudan Grass & Sorghum*. Univ. of Wisconsin, Dept. of Biochemistry.
- Boller, T., RC. Herner, H. Kende. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid. *Plant* 145: 293-303.
- Cagampang, B.G., & F.M. Rodrigues. 1980. *Methods of analysis for screening crops of approximate qualities*. Analytical Services Laboratory Institute of Plant Breeding, UPLB.
- Hoffman, N.E., S.F. Yang, A. Ichihara, & A. Sakamura. 1982. Stereo specific conversion of l-aminocyclopropane carboxylic acid to 1-butene. *Plant Physiol.* 70: 195-199.
- Hyodo, H. 1977. Ethylene production by albedo tissue of Satsuma mandarin (*Citrus anshia*) fruit. *Plant. Physiol.* 59: 111-113.
- Hyodo, H., C. Hashimoto, S. Morozumi, W. Hu, & K. Tanaka. 1993. Characterization and induction of the activity of 1-aminocyclopropane l-carboxylate oxidase in the wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol.* 34 (5): 667-6671.
- Hyodo, H., K. Tanaka, & J. Yoshisaka. 1985. Induction of 1-aminocyclopropane l-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 & l-aminocyclopropane l-carboxylic acid synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit. *Plant & Cell Physiol.* 24 (6): 963-969.
- Kawasaki, Y., T. Ogama, & K. Sasaoka. 1982. Two pathways for formation of D-amino acid conjugates in pea seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1-5.
- Lizada, Ma.C.C., & S.F. Yang. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane l-carboxylic acid. *Analytical Biochem.* 100: 140-145.
- Miller, J.M. & E.E. Conn. 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol.* 65: 1199-1202.
- Mizutani, F., Y. Satika, A. Hino, & K. Kadoya. 1988. Cyanide metabolism linked with ethylene biosynthesis in ripening processes of climacteric and non climacteric fruits. *Scientia Horticultura*, 35 (1988). 199-205.
- Mudijati-Gardjito, 2001. *Produksi Etilen Luka pada Mesokarp Labu Kuning*. PPHTRC unpublished research report.
- Peiser, G.D., T.T. Wang, N.E. Hoffman, S.F. Yang, H.W. Liu, & C. Walsh. 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of ACC during its conversion to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 81. 3059-3063.
- Sitrit, Y., J. Riov, & A. Blumenfeld. 1987. Interference of phenolic compounds with the l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid assay. *Plant Physiol.* 86. 0013-0015.
- Yang, S.F. & N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Yip, W.K., & S.F. Yang. 1988. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiol.* 88: 473-476.
- Yip, W.K., & S.F. Yang. 1993. Ethylene metabolism, In : Lea, P.J. (ed.). *Methods in plant Biochemistry*, Vol. 9. Enzymes of secondary metabolism. Academic Press, 431-446.