

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI SERBUK ENZIM BROMELIN DARI BATANG NANAS (*ANANAS COMOSUS (L.) MERR*).

### *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BROMELIN ENZYME POWDER FROM Pineapple Stem (ANANAS COMOSUS (L.) MERR).*

Rose Intan Perma Sari<sup>1\*</sup>, Salman<sup>2</sup>, Erizal Zaini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Bengkulu Jl. WR. Supratman, Kandang Limun, Sumatra, Bengkulu 38371.

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Andalas Limau Manis, Kc. Pauh, Kota Padang, Sumatra Barat 25175

\*Email Corresponding : [roseintan@unib.ac.id](mailto:roseintan@unib.ac.id)

*Submitted: 23 August 2022    Revised: 30 August 2022    Accepted: 27 September 2022*

#### ABSTRAK

Bromelin merupakan unsur pokok dari nanas yang penting dan berguna dalam bidang farmasi dan makanan, untuk mendapatkan enzim bromelin dari buah nanas diperlukan proses isolasi enzim bromelin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi serbuk enzim bromelin dari batang nanas (*Ananas Comosus (L.) Merr*). Isolasi enzim bromelin dari batang nanas telah dilakukan dengan menggunakan pelarut dapar fosfat pH 7.0 disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 15 menit. Serbuk enzim bromelin diperoleh dengan menggunakan metoda *freeze drying* dan didapat persentase randemen sebesar 2,032 %. Karakterisasi dari serbuk enzim bromelin terdiri dari pengukuran konsentrasi protein, penentuan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan metoda *Biuret* memberikan hasil konsentrasi sebesar 1,66±0,003 mg/ml. Penentuan aktivitas enzim menggunakan metoda *Murachi* memberikan hasil aktivitas enzim sebesar 43,09±0,01 U/ml dan aktivitas spesifik enzim sebesar 26,02±0,003 U/mg.

**Kata kunci:** Batang nanas, Serbuk Enzim Bromelin, Isolasi dan karakterisasi

#### ABSTRACT

*Bromelain is a staple element of pineapple which is important and useful in the pharmaceutical and food fields, to obtain the bromelain enzyme from pineapple, a bromelain enzyme isolation process is needed. The purpose of this study was to isolation and characterize of bromelain enzyme powder from pineapple (Ananas Comosus (L.) Merr) stems. Isolation of bromelain enzyme from pineapple stems was carried out using phosphate buffer pH 7.0 and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes. Bromelain enzyme powder was obtained using the freeze drying method and the yield percentage was 2.032 %. Characterization of bromelain enzyme powder consisted of Measurement of protein concentration, enzyme activity and enzyme specific activity. Measurement of protein concentration using the Biuret method gave a concentration of 1,66±0,003 mg/ml. Determination of enzyme activity using the Murachi method gave the result of enzyme activity of 43,09±0,01 U/ml and enzyme specific activity of 26,02±0,003 U/mg.*

**Keywords:** *Pineapple Stem, Bromelain Enzyme Powder, Isolation and Characterization*

## PENDAHULUAN

Di Indonesia banyak dibudidayakan tanaman nanas karena merupakan salah satu negara yang beriklim tropis yang sesuai dengan syarat tumbuh dari tanaman nanas. Berdasarkan bentuk daun dan buah dikenal 4 jenis nanas, diantaranya *cayenne* (daun halus, tidak berduri, buah besar), *queen* (daun pendek berduri tajam, buah lonjong mirip kerucut), *Spanish* (daun panjang kecil, berduri halus sampai kasar, buah bulat dengan mata datar), dan *abacaxi* (daun panjang berduri kasar, buah silindris, atau seperti piramida). Jenis nanas yang terdapat pada perkebunan di Indonesia adalah golongan *cayenne* dan *queen*. Sementara untuk golongan *Spanish* telah dikembangkan di kepulauan India Barat, Puerte Rico, Mexico, dan Malaysia (Media, 2009).

Nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr) merupakan salah satu komoditas unggulan di Indonesia, yang ditandai dengan tingginya produksi nanas yang menempati posisi ketiga setelah pisang dan mangga. Untuk wilayah Asia Tenggara, Indonesia termasuk penghasil nanas terbesar ketiga setelah Filipina dan Thailand dengan kontribusi sekitar 23% (Susanti, 2015). Peningkatan produksi nanas menyebabkan meningkatnya limbah dari nanas karena manusia hanya mengkonsumsi daging nanas dan komponen buah yang tidak digunakan dibuang menjadi limbah. Ditemukan bahwa hanya sekitar 30% dari seluruh berat buah nanas adalah bagian yang dimanfaatkan sedangkan sisanya yang 70% dianggap sebagai komponen yang tidak digunakan seperti kulit, inti, mahkota dan batang (Nor et al., 2015). Limbah dari nanas tersebut mengandung protein bromelain yang memiliki efek farmakologi (Ketnawa et al., 2012).

Bromelain atau *sulfhydryl proteolytic enzymes* adalah protein yang ditemukan dalam tanaman nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr) dari keluarga *Bromeliaceae* yang termasuk dalam kelompok enzim protease. Bromelain merupakan salah satu jenis enzim protease sulfhidril yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein atau polipeptida menjadi molekul yang lebih kecil (Bala et al., 2012). Bromelin dapat diperoleh dari tanaman nanas baik dari tangkai, kulit, daun, buah, maupun batang dalam jumlah yang berbeda tetapi bromelin lebih banyak terdapat pada batang nanas yang selama ini belum dimanfaatkan. Bromelain yang ditemukan dalam batang nanas (EC 3.4.22.32, sebelumnya EC 3.4.22.4), memiliki titik isoelektrik (PI) 9.5, dan merupakan protease paling melimpah di jaringan nanas dan bromelain yang ditemukan dalam buah nanas (EC 3.4.22.33, sebelumnya EC 3.4.22.5), memiliki PI 4.6, dengan jumlah protease yang lebih rendah dibandingkan dengan batang bromelai (Kumar et al., 2017; Maurer, 2001).

Untuk mendapatkan enzim bromelin dari buah nanas diperlukan proses isolasi enzim bromelin. Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler, enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain. Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan *supernatant* yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal (Volk, 1993).

Pada tahap akhir, enzim bromelin dilakukan proses pengeringan. Enzim bromelin merupakan enzim yang akan rusak pada suhu 60–70°C, sehingga diperlukan perlakuan pada tahap pengeringan agar enzim bromelin tidak mengalami kerusakan. Misalnya dengan menggunakan oven vakum atau *freeze drying* (pengering beku). Pengeringan dengan *freeze drying* atau pengering beku memiliki prinsip pengeringan yang berbeda dengan oven vakum. Pada oven vakum menggunakan suhu panas dan dibantu oleh tekanan vakum untuk penguapan air, sedangkan pada *freeze drying* menggunakan prinsip suhu dingin untuk penyubliman air. Suhu pengeringannya bisa mencapai -50°C. Penggunaan suhu rendah merupakan kelebihan penggunaan alat pengering *freeze drying*, karena suhu pengeringan yang digunakan tidak akan merusak enzim. (Ishak, 2012).

Preformulasi merupakan langkah awal dalam penelitian untuk memperoleh informasi yang dibutuhkan dalam proses formulasi sediaan obat yang stabil secara fisika, kimia dan dengan ketersediaan hayati yang menguntungkan. Preformulasi mulai berkembang pada akhir tahun 1950 dan awal tahun 1960, sebagai hasil dari perkembangan produk industri farmasi. Sampai pertengahan tahun 1950, penekanan hanya dalam perkembangan produk, untuk mengembangkan bentuk sediaan yang elegan dan pertimbangan organoleptis dari sediaan. Ruang lingkup preformulasi meliputi studi sifatsifat fisikokimia senyawa baru yang dapat mempengaruhi penampilan obat dan studi pengembangan bentuk sediaan yang manjur dengan rancangan formulasi yang rasional (Wells, 1987).

Bromelain merupakan unsur pokok dari nanas yang penting dan berguna dalam bidang farmasi dan makanan. Fungsi bromelin mirip dengan papain dan fisin, sebagai pemecah protein. Kegunaan lain dari bromelain adalah untuk menyembuhkan anti-inflamasi, artritis, sembelit, infeksi saluran pernafasan, luka atletik (pada kaki), angina, dan trauma penghambatan agregasi platelet, sinusitis, trauma bedah tromboflebitis, pyelonephriti angina pectoris, bronchitis (Bangun, 2005).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti mencoba untuk melakukan penelitian tentang Isolasi, Karakterisasi Dan Pengukuran Aktivitas Serbuk Enzim Bromelin Dari Batang Nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr).

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang nanas, Kalium Dihidrogen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Natrium Hidroksida ( $\text{NaOH}$ ), alkohol, kloroform, eter, dapar asetat pH 4, dapar fosfat pH 7, Tembaga (II) Sulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Kalium Natrium Tatriat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), *Bovin Serum Albumin* (BSA), tiroksin, kasein, trikloroasetat (TAC).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis simadzu (Shimadzu UV-1700), timbangan digital (fujitsu FSR-A 300), sentrifuge (Tube Centrifuge DKC-1008T), MN18C *freeze drying* multi-manifold standard type (0.18m).

### Jalannya Penelitian

#### 1. Isolasi Serbuk Enzim Bromelin (Herdyastuti, 2006)

Batang nanas dipotong kecil-kecil sebanyak 200 g kemudian dihaluskan dengan menambahkan 200 ml larutan dapar fosfat pH 7.0. Preparat halus ini kemudian disaring untuk mendapatkan sari batang yang selanjutnya disimpan di lemari es selama 24 jam, kemudian terbentuk 2 lapisan dimana lapisan atas adalah air dan lapisan bawah adalah ekstrak. Ekstrak yang muncul disentrifus dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh tiga lapisan. Lapisan kedua yaitu berupa koloid yang mengandung enzim bromelin diambil kemudian dikeringkan dengan *freeze draying* pada suhu  $-57^\circ\text{C}$  selama 22 jam hingga didapat enzim bromelin. Kemudian enzim bromelin yang telah kering diayak dengan ayakan mesh 48 hingga didapat serbuk enzim bromelin.

#### 2. Pengukuran Konsentrasi Protein

Evaluasi konsentarsi protein serbuk enzim bromelin menggunakan metoda spektrofotometri visible (Biuret) (Devakate *et al.*, 2009). Larutan enzim bromelin 1% sebanyak 4 ml ditambahkan 6 ml reagen Biuret dalam labu ukur 10 ml dibiarkan selama  $\pm 20$  menit sampai terbentuk warna ungu. Lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang 547 nm. Nilai absorbansi sampel disubstitusikan pada nilai Y kurva standar BSA, sehingga diperoleh nilai x yang merupakan konsentrasi protein sampel.

#### 3. Penentuan Aktivitas Enzim

Evaluasi aktivitas serbuk enzim bromelin menggunakan metoda Murachi (Ketnawa *et al.*, 2012). Larutan enzim bromelin 1% sebanyak 1 ml ditambahkan 1 ml larutan kasein 1% dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 30 menit.

Lalu ditambahkan larutan TCA 30 % sebanyak 2 ml, campuran diaduk dan didiamkan selama 5 menit, kemudian disentrifus pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit sehingga terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan endapan. Supernatan diukur absorbannya pada panjang gelombang 274 nm. Nilai absorbansi sampel disubstitusikan pada nilai y kurva standar tiroksin, sehingga diperoleh nilai x yang merupakan aktivitas enzim sampel.

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{\text{tiroksin} \times V \times FP}{p \times q}$$

Keterangan = tiroksin = konsentrasi tiroksin yang dihasilkan ( $\mu\text{m/ml}$ )

V = volume total sampel pada tiap tabung (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

p = jumlah enzim yang digunakan (ml)

FP = faktor pengenceran

$$\text{Aktifitas Spesifik} = \frac{\text{unit aktivitas}}{\text{konsentrasi protein}}$$

### Analisis Data

Analisa aktivitas enzim dari serbuk enzim bromelin dilakukan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Kemudian data yang diperoleh diolah dan disajikan dalam bentuk table.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Batang nanas yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang nanas yang buahnya baru selesai dipanen di kabupaten Kampar, provinsi Riau. Isolasi bromelin dari batang nanas dilakukan dengan memotong kecil-kecil batang nanas kemudian diblender dengan pelarut dapar fosfat pH 7,0 untuk mendapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Ukuran partikel yang lebih kecil akan membuat luas permukaan sampel yang mengalami kontak dengan pelarut semakin besar. Kontak dengan pelarut yang semakin besar akan memudahkan pelarut untuk menarik senyawa yang diinginkan. Adanya kontak antar penyari dengan sampel mengakibatkan adanya kesempatan penyari untuk masuk menembus membran sel dan menarik senyawa yang diinginkan. Isolasi enzim bromelin dari batang nanas dilakukan dengan menggunakan dapar fosfat pH 7.0 karena bromelin lebih stabil pada pH 7.0 yang merupakan pH optimumnya (Herdyastuti, 2006).

Hasil penyaringan yang telah didapat kemudian didinginkan sampai pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk menjaga supaya enzim tidak rusak dan tetap stabil, serta menjaga keberadaan aktivitas dari enzim bromelin. Selain menjaga proses ekstraksi dalam keadaan dingin dapat menjaga enzim dari denaturasi dan degradasi. Hal ini disebabkan enzim secara struktur sangat labil dan sangat rentan terhadap degradasi mikroba. Denaturasi dan degradasi dapat diminimalisir dengan menjaga enzim dalam keadaan dingin pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Filtrat kemudian disentrifugasi supaya enzim terpisah dari sisa-sisa jaringan nanas. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 3.500 rpm selama lebih kurang 15 menit sehingga didapatkan tiga lapisan yang mana lapisan atas berupa air, lapisan tengah berupa koloid dan lapisan bawah berupa pati. Dari ketiga lapisan tersebut hanya lapisan tengah (koloid) yang dibutuhkan karena pada lapisan itu banyak mengandung enzim bromelin dan sebagai ekstrak enzim bromelin. Kemudian ekstrak enzim bromelin dikeringkan dengan menggunakan *freeze drying* pada suhu  $-57^{\circ}\text{C}$  selama 22 jam. *Freeze drying* menggunakan prinsip suhu dingin untuk penyubliman air, penggunaan suhu rendah merupakan kelebihan penggunaan alat pengering *freeze drying* karena suhu pengeringan yang digunakan tidak akan merusak enzim.



**Gambar 1. Serbuk Enzim Bromelin**

Karakterisasi serbuk enzim bromelin dengan mengukur konsentrasi protein, aktivitas enzim dan enzim spesifik. Menurut Ritonja *et al.* (1989), enzim bromelin adalah kompleks endopeptidase tiol dan komponen non-protease, termasuk fosfatase, glikosidase, peroksidase, selulase, glikoprotein, ribonuklease, karbohidrat, dan lainnya. Karena enzim bromelin mengandung senyawa selain protein maka harus ditentukan jumlah konsentrasi protein total dari bromelin menggunakan metode spektrofotometri visible (Biuret). Metode spektrofotometri visible (Biuret) merupakan salah satu cara yang terbaik untuk menentukan konsentrasi protein suatu larutan karena memiliki kelebihan metode yang mudah, cepat dan tidak merusak kandungan protein yang ada dalam sampel. Prinsip metode ini adalah zat yang mengandung dua atau lebih peptida yang dapat membentuk kompleks berwarna ungu dengan ion  $\text{Cu}^{2+}$  yang intensitasnya dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer. Pada metode spektrofotometri visible (Biuret) ini sering digunakan larutan protein standar yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA). Albumin merupakan salah satu jenis protein globuler yang larut dalam air dan Protein ini tidak mempengaruhi enzim lain. BSA umumnya digunakan untuk menentukan jumlah protein lain, dengan membandingkan jumlah protein yang tidak diketahui dengan jumlah BSA yang diketahui. BSA digunakan karena kemampuannya untuk meningkatkan sinyal dalam pengujian, tidak memiliki efek dalam banyak reaksi biokimia dan biaya yang rendah.

Sebelum dilakukan pemeriksaan konsentrasi protein serbuk enzim bromelin dengan metoda Biuret, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang serapan maksimum bovine serum albumin (BSA). Dengan membuat larutan induk BSA, lalu diukur serapan pada panjang gelombang 500-600 nm dan didapatkan panjang gelombang maksimum 547 nm. Pembuatan kurva standar bovine serum albumin (BSA) dengan larutan seri pengenceran dari larutan induk, lalu diukur adsorbannya pada panjang gelombang max 547 nm, sehingga didapat persamaan regresi linier  $y = 0,0002x + 0,0091$ . Persamaan regresi yang didapat kemudian digunakan dalam menentukan nilai konsentrasi protein enzim bromelin. Konsentrasi protein pada serbuk enzim bromelin sebesar  $1,66 \pm 0,003$  mg/ml.

Sebelum dilakukan pemeriksaan aktivitas serbuk enzim bromelin dengan metoda Murachi. Terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang serapan maksimum tiroksin, dengan membuat larutan induk tiroksin kemudian diukur serapan pada panjang gelombang 200-400 nm dan didapat panjang gelombang maksimum 274 nm. Pembuatan kurva standar tiroksin dengan membuat larutan seri pengenceran dari larutan induk, lalu ukur adsorbannya pada panjang gelombang max 274 nm dan didapat persamaan regresi linier  $y = 0,0053x + 0,0055$ . Persamaan regresi yang didapat kemudian akan digunakan dalam menentukan nilai aktivitas enzim dan aktifitas spesifik dari serbuk enzim bromelin.

Tirosin merupakan asam amino aromatik yang digunakan sebagai larutan standar pada metoda Murachi untuk menentukan aktivitas enzim. Persamaan linier tirosin akan digunakan sebagai kurva standar untuk diinterpolasikan dengan nilai adsorban yang diperoleh, dimana unit aktivitas dinyatakan dalam 1 mikro mol tirosin yang dihasilkan per ml enzim dalam waktu tertentu. Metode ini didasarkan atas hidrolisis enzimatis oleh enzim yang teruji dari larutan substrat kasein 1% dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit tujuan dari diinkubasi untuk mempercepat terjadinya aktivitas enzim bromelain, kasein berfungsi sebagai substrat enzim dalam melakukan aktivitas perombakannya .

Kemudian dilanjutkan dengan menghentikan aktivitas enzim dan pengendapan dari substrat yang tidak terhidrolisis menggunakan pereaksi asam trichloroasetat (TCA) 30%, TCA bersifat asam berfungsi untuk menghentikan aktivitas enzim dan dapat menggumpalkan atau mengendapkan kasein. Menurut [Lehninger \(1982\)](#), jika enzim direaksikan dengan asam kuat maka rantai polipeptidanya akan terpotong sehingga terjadi konformasi struktur yang dapat menyebabkan aktivitas katalitiknya hilang. Aktivitas enzim pada serbuk enzim bromelin sebesar  $43,09 \pm 0,01$  U/ml, sedangkan untuk aktivitas spesifik serbuk enzim bromelin sebesar  $26,02 \pm 0,003$  U/mg.

**Tabel I. Hasil Pemeriksaan Konsentrasi Protein, Aktivitas Enzim dan Aktifitas Spesifik Enzim Bromelin**

| Sampel                | Konsentrasi Protein (mg/ml) | Unit Aktivitas (U/ml) | Aktivitas Spesifik (U/mg) |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Serbuk Enzim Bromelin | $1,66 \pm 0,003$            | $43,09 \pm 0,01$      | $26,02 \pm 0,003$         |

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan metoda Biuret memberikan hasil konsentrasi sebesar  $1,66 \pm 0,003$  mg/ml.
2. Penentuan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik menggunakan metoda Murachi memberikan hasil aktivitas enzim sebesar  $43,09 \pm 0,01$  U/ml dan aktivitas spesifik sebesar  $26,02 \pm 0,003$  U/mg.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan kali ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Bapak Dr. Salman, M. Si, Apt dan Prof. Dr. Erizal Zaini, M.S., Apt. sebagai pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dukungan, saran, dan kritik dalam penulisan penelitian ini serta kepada Universitas Andalas yang telah memfasilitasi selama kegiatan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bangun, A. P. (2005). *Menangkal Penyakit dengan Jus Buah dan Sayuran*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Bala, M., Ismail, N. A., Mel, M., Jami, M. S., Mohd Salleh, H., & Amid, A. (2012). Bromelain production: Current trends and perspective. *Archives Des Sciences*.
- Departemen Kesehatan (1979). *Farmakope Indonesia*. (Edisi III). (Dirjen POM RI). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: *Departemen Kesehatan Republik Indonesia*.
- Devakate, R. V., Patil, V. V., Waje, S. S., & Thorat, B. N. (2009). Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.09.012>
- Herdyastuti, N. (2006). Isolasi dan Karakteristik Ekstrak Kasar Enzim Bromelain dari Batang Nenas (*Ananas comosus* L. Merr). *Jurnal Berk. Penel. Hayati* 12, 75 – 77.
- Ishak, M. christy. (2012). *Pengaruh Proses Pengeringan Dan Imobilisasi Terhadap Aktivitas Dan Kestabilan Enzim Bromelain Dari Buah Nenas (Ananas Comosus (L) Merr)*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
7. Yeo Y, Baek N, Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2001; 6 (4); 213-230.

- Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>
- Kumar, S., & Lambda, M. (2017). *Comparative study of extraction , purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant Abstract : 34*(September), 67–76.
- Lehninger, A. L. (1982). *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Leuner, C., & Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.  
[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00076-X)
- Lourenço, C. B., Ataíde, J. A., Cefali, L. C., Novaes, L. C. d. L., Moriel, P., *et al.* (2016). Evaluation of the enzymatic activity and stability of commercial bromelain incorporated in topical formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(5), 535–540. <https://doi.org/10.1111/ics.12308>
- Maurer, H. R. (2001b). *review*)Bromelain biochemistry pharmacology and medical.pdf. 58, 1234–1245.
- Media, A. (2009). *Buku Pintar Budidaya Tanaman Buah Unggul Indonesia*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka.
- Nor, M. Z. M., Ramchandran, L., Duke, M., & Vasiljevic, T. (2015). Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. *Journal of Food Science and Technology*.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1812-5>
- Ritonja, A., Rowan, A. D., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V., & Barrett, A. J. (1989). Stem bromelain: Amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81383-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81383-3)
- Rocky. (26 Agustus 2009). Tanduran panen: Sejarah, Klasifikasi Dan Morfologi Nanas, Diakses 21 April 2011 dari <http://www.rocky16amelungi.word.press.com>.
- Susanti, A. A. (2015). Outlook Nenas. *Pusat Data Dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian*.
- Voight, R. (1994). Buku Pelajaran Teknologi Farmasi (Edisi V). (Diterjemahkan oleh Soedani Noerono). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Volk. (1993). Mikrobiologi Dasar Jilid 1. In *Microbiology*.
- Wells, J. I. (1987). *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*. Wingham: Ellis Horwood Limited

