

Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Bonggol Nanas (*Ananas comosus*) pada Variasi Suhu dan pH

MASHURI MASRI

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar
Jl. Sultan Alauddin 36 Samata, Kab. Gowa 92113
email: mashurimasri@uin-alauddin.ac.id

ABSTRACT

This study was conducted to isolate the bromelain enzyme from pineapple weevil (*Ananas comosus*) and measure the protein and enzyme activity of bromelain with gelatin substrate. Research stage involves determining the protein content of the bromelain enzyme in the treatment of ammonium sulfate precipitation by 10-60% concentration and determination of bromelain enzyme activity at various pH 4.0; 5.0; 6.0; 7.0 and 8.0, with the incubation time of 10 minutes at a temperature of 650 C. Each stage performed three repetitions and analyzed using spectrometry. The results obtained showed the highest protein content in precipitation with ammonium sulfate 60% in the amount of 37.214 mg / ml and the optimum pH of bromelain enzyme activity at pH 7.0 with the value of the activity of 1,081 units / gram.

Keywords: ammonium sulfate precipitation, bromelain enzyme, pineapple weevil (*Ananas comosus*), pH

PENDAHULUAN

Nanas termasuk tanaman herba epifit, umumnya memiliki batang pendek. Daunnya panjang dan sempit, umumnya berkumpul di dasar atau merupakan roset, serta memiliki duri. Bunga terminal (Syamsiah, 2006). Nanas termasuk buah buni majemuk, jika bakal buah masing-masing bunga dalam bunga majemuk membentuk suatu buah buni. Pada buah nanas pada pembentukan buah ikut pula mengambil bagian daun-daun pelindung dan daun-daun tenda bunga, sehingga keseluruhannya nampak sebagai satu buah saja. Keseluruhan buah yang bergabung menjadi satu dihubungkan oleh batang tengah yang disebut hati/bonggol (Tjitrosoepomo, 2009). Adapun klasifikasi dari tanaman nanas adalah sebagai berikut:

Divisio : Magnoliophyta
Classis : Liliopsida
Subclassis : Zingiberidae
Ordo : Bromeliales
Familia : Bromeliaceae
Genus : *Ananas*
Species : *Ananas comosus*

(Gembong dalam Syamsiah, 2006).

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) sejak tahun 70-an telah menyadari,

bahwa enzim akan memiliki peranan penting dalam industri. Enzim adalah protein tidak beracun namun mampu mempercepat laju reaksi kimia dalam suhu dan derajat keasaman yang sesuai. Enzim akan menghasilkan produk yang sangat spesifik sehingga dapat diperhitungkan dengan mudah. Pada saat ini dan bahkan di masa yang akan datang, enzim menjadi primadona industri karena melalui penggunaannya, energi dapat dihemat dan akrab dengan lingkungan. Saat ini penggunaan enzim dalam industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kulit dan kertas di Indonesia semakin meningkat (Lipi, 2013).

Bromelin adalah enzim yang diekstrak dari buah nanas (*Ananas comosus*). Bromelin diisolasi dari buah nanas dengan menghancurkan daging buah untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim bromelin (Hairi, 2010). Bromelin ini berbentuk serbuk amori dengan warna putih bening sampai kekuning-kuningan, berbau has, larut sebagian dalam aseton, eter, dan CHCl_3 (Fajrin, 2012).

Penggunaan nama bromelin untuk enzim pemecah protein yang berasal dari nanas sekilas menimbulkan kesan tidak taat asas, karena nama nanas adalah *Ananas comosus*, walaupun tanaman ini termasuk tanaman

Bromeliaceae. Tampaknya, penamaan enzim menurut organisme sumber ini hanya berhasil dilakukan terhadap enzim tumbuh-tumbuhan dan itupun jumlahnya tidak banyak. Bersamaan dengan itu, penggunaan akhiran –in pada nama enzim mulai ditinggalkan dan hanya bertahan pada enzim yang sudah terlanjur dikenal dengan tatanama seperti itu (Sadikin, 2002).

Bromelin termasuk ke dalam golongan sufrihidil yang mengandung enzim proteolitik. Selain itu juga mengandung peroksida, asam fosfat, beberapa protease inhibitor, dan organik yang mengikat kalsium. Enzim bromelin menghidrolisis protein yang mengandung ikatan peptida menjadi asam amino yang lebih sederhana. Dalam hal ini sistein endopeptidase secara khusus memotong ikatan peptida pada gugus karbonil seperti yang ditemukan dalam ariginin atau asam amino aromatik yaitu fenilalanin atau tirosin (Gautam *et al.*, 2010).

Enzim bromelain termasuk golongan glikoprotein yaitu protein yang mengandung satu bagian oligosakarida pada tiap molekul, yang terikat secara kovalen dengan rantai polipeptida enzim tersebut. Adapun deretan asam amino disekitar lokasi aktifnya: -Cys – Gly – Ala – Cys – Trp-Asn – Gly – Asp – Pro – Cys – Gly – Ala – Cys – Cys – Trp. Sistein (Cys) menunjukkan tempat lokasi aktifnya (Gautam *et al.*, 2010).

Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu diketahui bahwa nanas beserta limbahnya (batang dan kulit) dapat, menghasilkan enzim bromelin. Enzim ini dapat diisolasi dari daging buah, kulit buah, bonggol (hati), tangkai daun, dan daun (Suhermiyati dan Setyawati, 2005).

Buah nanas yang muda maupun yang tua juga mengandung enzim bromelin. Buah nanas muda mengandung enzim bromelin lebih banyak. Sedangkan buah nanas yang matang enzim bromelin lebih sedikit dibandingkan yang muda (Hairi, 2010).

Aktivitas bromelin optimum pada suhu 50°C, di atas suhu tersebut keaktifan akan menurun. pH optimum 6,5-7 dimana enzim akan mempunyai konformasi yang mantap dan aktivitas maksimal (Fajrin, 2012).

Bromelin merupakan unsur pokok dari nanas yang penting dan berguna dalam bidang farmasi dan makanan. Fungsi bromelin mirip dengan papain dan fisin, sebagai pemecah protein. Pada akhir-akhir ini enzim bromelin lebih banyak digunakan untuk penjernihan bir (“chillpoofing bir”) dan pengempukan daging. Selain itu enzim bromelin sering pula dimanfaatkan sebagai bahan kontrasepsi KB untuk memperjarang kehamilan. Ibu-ibu yang sedang mengandung tidak dianjurkan makan nanas karena dapat mengakibatkan keguguran (Wuryanti, 2004).

Enzim bromelin merupakan enzim protease seperti halnya renin (renet), papain dan fisin yang mempunyai sifat menghidrolisis protein (Effendi, Winarni dan Sumarni, 2012, 2). Hidrolisis yang terjadi dengan enzim protease adalah putusannya ikatan peptida dari ikatan substrat, di mana enzim protease bertugas sebagai katalisator di dalam sel dan bersifat khas (Suhermiyati dan Setyawati, 2005).

Uji Bradford merupakan suatu uji dengan tujuan untuk mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam suatu larutan. Pada uji Bradford melibatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue (CBB) yang akan berikatan dengan protein dalam suatu larutan. Dari warna yang dihasilkan, secara kolorimetri maka dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri (Lambert-Beer) pada panjang gelombang 465-595 nm (cahaya tampak) (Bradford, 1976).

METODE

Pembuatan Ekstrak Kasar Bonggol Buah Nanas. Isolasi ekstrak bonggol nanas dilakukan berdasarkan metode Gautam, *et al.* (2010, 67-76). Bonggol nanas yang digunakan pada penelitian ini yaitu nanas yang masih mengkal, ditandai dengan warna kulitnya hijau kekuningan. Bonggol nanas dicuci dengan aquades, kemudian dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 500 gram. Selanjutnya dihomogenisasi dengan menggunakan 66,67 ml larutan buffer natrium asetat (pH 6,5), dan kemudian disaring.

Pengendapan dengan Amonium Sulfat. Presipitasi ekstrak kasar enzim bromelin

diadaptasi dari Soares, *et al.* (2010). Pengendapan dilakukan dengan cara penambahan amonium sulfat sebanyak 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%. Masing-masing 7 ml ammonium sulfat ditambahkan 3 ml ekstrak kasar bonggol nanas yang telah disaring sambil diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 45 menit. Selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 4°C di dalam lemari es. Setelah itu, disentrifugasi pada 3500 rpm selama 25 menit untuk memisahkan ekstrak kasar enzim dari sisa-sisa jaringan nanas. Hasil sentrifugasi akan didapatkan supernatan dan pelet yang merupakan ekstrak kasar enzim bromelin. Pelet yang dihasilkan dicuci dengan 10 mL buffer natrium asetat 0,1 M pada kisaran pH 6,5. Pengamatan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

Penentuan Kadar Protein Ekstrak Enzim Bromelin. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Uji Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan. Dalam uji Bradford melibatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan). Karena menghasilkan warna biru maka absorbansi diukur pada λ 595 nm. Kadar protein ditentukan dengan membandingkan absorbansi ekstrak enzim bromelin dengan kurva standar gelatin.

1. Pengukuran Larutan Standar Protein. Sebelum melakukan pengukuran larutan standar protein maka terlebih dahulu dibuat larutan standar protein dengan cara menimbang 0,01 g gelatin kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquades steril sehingga diperoleh larutan stok gelatin pada konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok pada konsentrasi 1000 ppm diencerkan dengan melarutkan 0,5 ml larutan stok ditambahkan 4,5 ml aquades steril sehingga diperoleh larutan stok gelatin 100 ppm. Dari larutan stok tersebut dilakukan pengukuran terhadap standar protein terlarut dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm. Kemudian

dilakukan pengukuran terhadap standar protein dengan menambahkan 0,05 ml seri larutan standar dengan 2,5 ml reagen Bradford. Pengamatan dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Kemudian larutan divortex dan di inkubasi pada suhu ruang selama 10-60 menit. Larutan ini memberikan warna biru dan selanjutnya diukur absorbansinya pada λ 595 nm.

2. Pengukuran Protein Terlarut. Pengukuran sampel dilakukan dengan cara 0,5 ml seri ekstrak enzim kasar ditambahkan dengan 2,5 ml reagen Bradford divortex lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 10-60 menit. Pengamatan dilakukan 3 kali pengulangan. Absorbansi larutan sampel protein selanjutnya diukur pada λ 595 nm.

Penentuan pH Optimum Enzim Bromelin. Sebanyak 0,125 ml gelatin ditambahkan dengan 0,5 ml buffer asam fosfat 1M (pH 6,5) dan 0,125 gram ekstrak enzim bromelin yang telah dikeringkan dalam oven selama 15 menit pada suhu 50°C. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit pada nilai pH yakni : 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0. Pengamatan dilakukan 3 kali pengulangan. Reaksi dihentikan dengan pemanasan pada air mendidih selama 10 menit. Setelah itu, absorbansi diukur pada λ 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

Analisis Data. Penentuan kadar protein ditentukan dengan membandingkan absorbansi ekstrak enzim bromelin dengan persamaan linear kurva standar gelatin. Sedangkan aktivitas enzim bromelin dapat ditentukan dengan rumus di bawah ini:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Substrat Terhidrolisis}}{\text{BM Enzim}} \times \frac{\text{Volume Larutan}}{\text{Berat Enzim}}$$

$$\text{BM Enzim} = 181.19 \text{ g/mol (Ishak, 2012)}$$

HASIL

Pengukuran Kadar Protein Enzim Bromelin pada Variasi 10-60 % Amonium Sulfat. Pengukuran kadar protein enzim

bromelin dari ekstrak bonggol nanas diberikan perlakuan yaitu bonggol nanas yang telah disaring akan ditambahkan larutan amonium sulfat dengan variasi 10 %, 20 %, 30 %, 40 %,

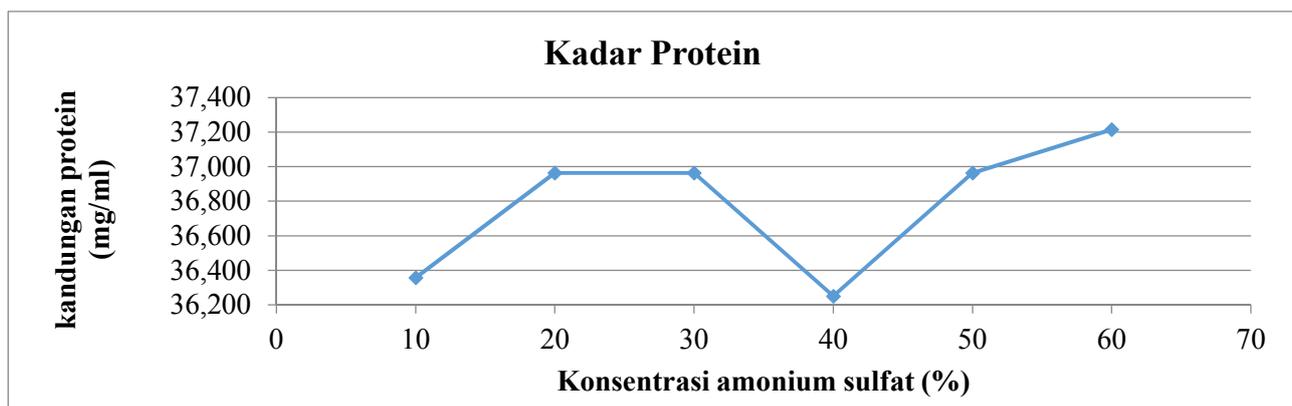
50 % dan 60 % lalu diinkubasi agar enzim bromelin akan terendapkan. Adapun kadar protein yang diperoleh pada pengendapan amonium sulfat ini dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar Protein Enzim Bromelin dari Ekstrak Bonggol Nanas pada Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Konsentrasi (%)	U1 (nm)	U2 (nm)	U3 (nm)	Jumlah (nm)	Rata-rata (nm)	Kadar protein ($\mu\text{g/ml}$)
10	0,974	0,974	1	2,948	0,983	36,357
20	1	1	1	3	1	36,964
30	1	1	1	3	1	36,964
40	1	0,94	1	2,94	0,980	36,250
50	1	1	1	3	1	36,964
60	1	1	1,02	3,02	1,007	37,214

Keterangan:

U1 = ulangan 1. U2 = ulangan 2. U3 = ulangan 3



Gambar 1. Grafik Pengaruh Konsentrasi Amonium Sulfat terhadap Pengendapan Protein Enzim Bromelin

Pengukuran Aktivitas Enzim pada Variasi Ph. Aktivitas enzim bromelin diukur berdasarkan kemampuannya menghidrolisa substrat gelatin pada suhu inkubasi 65°C.

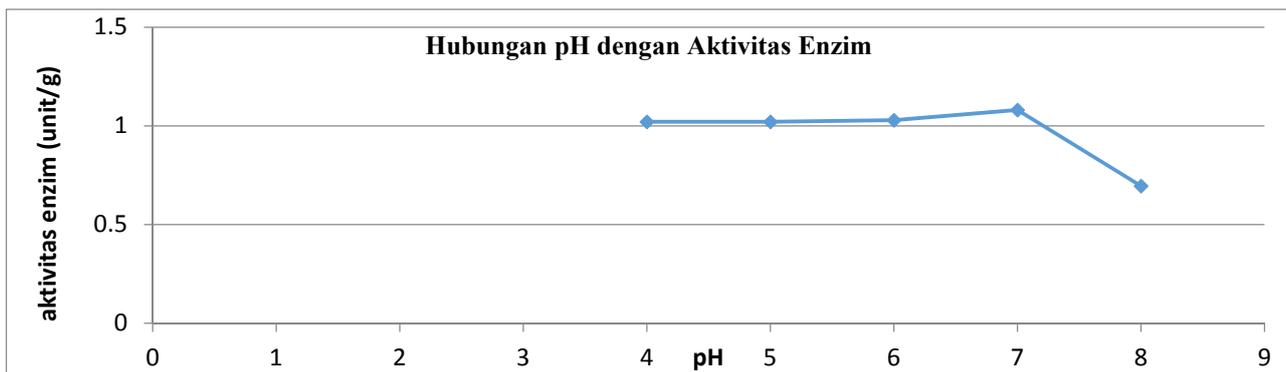
Pengukuran dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Bonggol Nanas pada Variasi pH

pH	U1 (nm)	U2 (nm)	U3 (nm)	Rata-rata (nm)	Substrat terhidrolisis (g/ml)	Aktivitas enzim (unit/g)
4	1	1	1	1	36,964	1,020
5	0,996	1,002	1,006	1,001333	37	1,021
6	1,004	1,025	0,998	1,009	37,286	1,029
7	0,983	1,005	1,199	1,062333	39,179	1,081
8	0,994	0,01	1,007	0,670333	25,179	0,695

Keterangan:

U1 = ulangan 1. U2 = ulangan 2. U3 = ulangan 3



Gambar 2. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Bromelin

PEMBAHASAN

Enzim bromelin adalah enzim yang diekstrak dari buah nanas (*Ananas comosus*). Bromelin termasuk ke dalam golongan sufrihidil yang mengandung enzim proteolitik. Selain itu juga mengandung peroksida, asam fosfat, beberapa protease inhibitor, dan organik yang mengikat kalsium. Enzim bromelin menghidrolisis protein yang mengandung ikatan peptida menjadi asam amino yang lebih sederhana. Dalam hal ini sistein endopeptidase secara khusus memotong ikatan peptida pada gugus karbonil seperti yang ditemukan dalam arginin atau asam amino aromatik yaitu fenilalanin atau tirosin (Gautam *et al.*, 2010). Dalam penelitian ini substrat yang digunakan yaitu gelatin. Gelatin merupakan protein yang mengandung 19 asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida termasuk arginin dan tirosin (Hajrawati, 2006).

Jika ekstrak kasar enzim bromelin telah didapatkan maka selanjutnya ekstrak akan diukur kadar proteinnya dengan membandingkan absorbansi ekstrak enzim bromelin dengan kurva standar gelatin. Kadar protein enzim bromelin dari ekstrak kasar bonggol nanas diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer akan menentukan kadar protein baik secara kuantitatif maupun kualitatif dengan mengukur transmitansi ataupun absorbansi larutan blanko ataupun pembanding. Dari hasil pembacaan spektrofotometer pada λ 595 nm maka diperoleh kurva standar gelatin dengan persamaan regresi $y = 0,028x - 0,035$.

Pengukuran Kadar Protein Enzim Bromelin pada Variasi 10-60 % Amonium Sulfat.

Amonium sulfat berfungsi untuk mengendapkan protein bromelin tanpa ikut mengendapkan protein non bromelin. Selain itu, amonium sulfat juga menghasilkan peningkatan kemurnian bromelin. Beberapa protein berbeda kelarutannya dalam konsentrasi garam yang berbeda. Pengendapan dengan amonium sulfat dapat dilakukan pada konsentrasi 10-100 %. Semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat maka pengendapan protein semakin baik namun pengendapan dengan amonium sulfat terdapat titik kejenuhannya. Menurut Soares, *et al.* (2010) pengendapan protein enzim bromelin dengan amonium sulfat dari ekstrak kasar daging buah paling baik pada konsentrasi 40 % namun jika sudah berada pada konsentrasi 60-100 % maka pengendapannya semakin berkurang dikarenakan larutan protein mengalami titik kejenuhan.

Pada penelitian ini digunakan variasi amonium sulfat 10-60 % untuk mengendapkan enzim bromelin. Hasilnya belum didapatkan titik kejenuhan amonium sulfat untuk mengendapkan enzim bromelin dari bonggol nanas namun pengendapan tertinggi terjadi pada konsentrasi 60 % dengan kadar protein 37,214 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menandakan konsentrasi 60 % mencapai titik isolistrik protein yang diinginkan. Pada titik isolistrik kelarutan protein berkurang non bromelin hingga minimum dan protein yang diinginkan akan mengendap, sedangkan protein lain yang tidak diinginkan tetap dalam larutan.

Pengendapan tersebut dapat terjadi karena adanya persaingan antara garam dan protein untuk mengikat air. Ion-ion pada protein mengikat banyak molekul air dengan sangat kuat. Namun ion-ion garam memiliki densitas muatan yang lebih besar dibandingkan protein sehingga garam dapat lebih mengikat molekul air. Menurunnya jumlah air yang terikat pada protein menyebabkan gaya tarik menarik antara molekul protein lebih kuat bila dibandingkan dengan gaya tarik menarik antara molekul protein dan air (mempertinggi interaksi hidrofobik), sehingga protein akan mengendap dari larutan atau berikatan dengan kolom hidrofobik.

Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin pada Variasi pH. Pada penelitian ini didapatkan aktivitas tertinggi berada pada pH 7,0 yaitu 1,081 unit/g dengan substrat terhidrolisis sebesar 39,179 $\mu\text{g/ml}$. Dari bentuk kurva pada gambar 4.4, tampak bahwa pH optimum dari aktivitas enzim bromelin dari ekstrak kasar bonggol nanas berada pada pH 7,0. Hal ini menandakan bahwa pada pH 7,0 enzim mempunyai konformasi yang paling sesuai dengan substrat gelatin sehingga dapat membentuk kompleks enzim-substrat yang tepat (Puspita, 2005). Pada pH optimum terjadi perubahan ionisasi dalam gugus ionik enzim pada sisi aktifnya atau pada sisi lainnya yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus pemberi dan penerima proton berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan, sehingga konformasi sisi aktif menjadi efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk (Nielsen *et al.*, 1999).

Pada pH 4,0; 5,0; 6,0; dan 8,0 aktivitas enzim lebih rendah dibandingkan dengan pH 7,0 hal ini dikarenakan pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi aktivitas enzim akan menurun, rantai samping beberapa asam amino berperan sebagai asam atau basa lemah yang melakukan fungsi kritis pada sisi aktif enzim sehingga enzim menjadi inaktif. Hal ini menyebabkan perubahan pH mengakibatkan perubahan intramolekuler dari enzim (Lehninger, 2009). Selain itu penurunan aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh lingkungan di sekitar sisi aktif enzim mengalami kekurangan jumlah proton

(Wiradikusumah, 2001). Pada umumnya aktivitas maksimum enzim berada pada kisaran pH optimum 4,5-8,0. pH optimum enzim bromelin dari ekstrak kasar bonggol nanas berbeda dengan pH optimum enzim bromelin yang didapatkan dari ekstrak kasar batang nanas. Menurut Nurhidayah (2013) pH optimum enzim bromelin dari ekstrak kasar dari batang nanas berada pada pH 6 sedangkan pH optimum enzim bromelin yang diisolasi dari ekstrak kasar bonggol nanas berada pada pH 7. Hal tersebut dikarenakan sumber enzim diisolasi dari organ yang berbeda meskipun enzimnya sama. Menurut Winarmo (1986) enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum mempunyai stabilitas yang tinggi. Dalam hal ini, enzim yang sama sering kali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim tersebut.

KESIMPULAN

Semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat maka semakin banyak kadar protein enzim bromelin dari bonggol nanas yang diendapkan. Pada penelitian ini konsentrasi 60% menghasilkan kadar protein yang tertinggi yaitu 37,214 $\mu\text{g/ml}$.

pH lingkungan sangat mempengaruhi aktivitas enzim bromelin dari bonggol nanas pH rendah atau pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Pada penelitian ini jumlah aktivitas enzim dari pH 4,0 sampai pH 7,0 mengalami kenaikan sedangkan di pH 8,0 sudah mengalami penurunan. pH optimum enzim bromelin yang diekstrak dari bonggol nenas berada pada pH 7,0 dengan substrat terhidrolisis sebesar 39,179 $\mu\text{g/ml}$ dan aktivitas enzim sebesar 1,081 unit/g.

Isolasi enzim bromelin dapat dilakukan pada organ lain dari buah nenas dan penelitian selanjutnya dapat digunakan kisaran variasi pH yang sempit.

DAFTAR PUSTAKA

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing

- The Principle of Protein-Dye Binding. Georgia: Anal Biochem University of Georgia.
- Gautam et al. 2010. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai J. Pharm. Sci.* vol 34(1):1.
- Fajrin E. 2012. Penggunaan Enzim Bromelin Pada Pembuatan Minyak Kelapa (*Cocos nucifera*) Secara Enzimatis. [Skripsi]. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Hairi M. 2010. Pengaruh Umur Buah Nanas dan Konsentrasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin Pada Pembuatan Virgin Coconut Oil dari Buah Kelapa Typical (*Cocos nucifera* L.) [Skripsi]. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hajrawati. 2006. Sifat Fisik dan Kimia Gelatin Tulang Sapi Dengan Perendaman Asam Klorida Pada Konsentrasi dan Lama Perendaman yang Berbeda. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ishak MC. 2012. Pengaruh Proses Pengeringan dan Imobilisasi Terhadap Aktivitas dan Kestabilan Enzim Bromelin dari Buah Nana (*Ananas comosus*). [Skripsi]. Makassar: Jurusan Teknologi Pertanian Universitas Hasanuddin.
- Lehninger AL. 2009. Dasar – Dasar Biokimia. Jilid 1. Penerjemah Maggy T. Jakarta: Erlangga.
- LIPI. 2011. Enzim. Pusat Penelitian Bioteknologi. <http://www.biotek.lipi.go.id>. Diakses 11 Januari 2011.
- Nielsen et al. 1999. Electrostatics in The Active Site of An α -Amylase. *Eur. J. Biochem.* vol 246: 816-824.
- Nurhidayah. 2013. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Batang Nanas (*Ananas comosus*) Pada Variasi Suhu dan pH. [Skripsi]. Makassar: UIN Alauddin Makassar.
- Sadikin MH. Biokimia Enzim. Jakarta: Widya Medika, 2002.
- Soares P et al. 2010. Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly (Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. Brazil: Universidade de São Paulo, 2010. <http://www.method-of-bromelain-extraction.pdf>. Diakses 19 Mei 2013.
- Suhermiyati S dan Sylvia JS. 2005. Potensi Limbah Nanas untuk Peningkatan Kualitas Limbah Ikan Tongkol sebagai Bahan Pakan Unggas. Purwokerto: Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Sudirman. *Animal Production.* vol. 10(3):174-178.
- Syamsiah. 2006. Taksonomi Tumbuhan Tinggi. Makassar: Universitas Negeri Makassar.
- Puspita A. 2005. Determination of Optimum Condition of Papain Enzyme from Papaya var Java (*Carica papaya*). *International Journal Chemistry.* vol 5(2):1.
- Tjitrosoepomo G. 2009. Morfologi Tumbuhan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Winarno FG. 1986. Enzim Pangan. Jakarta: Gramedia.
- Wirahadikusumah M. 2001. Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat. Bandung: Institut TB.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin Dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.). Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro. *JKSA.* vol VII(3):1.