

## Ekstraksi Bromelain Kasar dari Limbah Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) dan Kecernaan Proteinnya secara *In Vitro*

J. Wiboonsirikul\*, P. Khuwijitjaru<sup>2</sup>, dan R. Klahan<sup>3</sup>

Diterima: 05 Juni 2022 / Disetujui: 25 Oktober 2023

### ABSTRAK

**Tujuan:** Bromelain kasar banyak terdapat pada limbah buah nanas dan dapat dimanfaatkan pada budidaya udang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyelidiki kondisi ekstraksi dan mengevaluasi pencernaan protein *in vitro* dari pakan udang yang disuplemen dengan ekstrak bromelain kasar.

**Metode Penelitian:** Bromelain mentah diekstraksi dari limbah buah nanas dengan air suling atau air keran dan pH-nya disesuaikan, berkisar antara 5 hingga 9. Berbagai tahap kematangan dan rasio berat limbah terhadap air diteliti lebih lanjut. Aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik tertinggi dari ekstrak dipilih untuk kondisi ekstraksi yang sesuai. Kecernaan protein *in vitro* dari bungkil kedelai dan pakan udang yang diolah terlebih dahulu dengan ekstrak bromelain mentah dievaluasi untuk menentukan kelayakan penggunaannya dalam budidaya udang.

**Temuan:** Bromelain kasar yang diperoleh dari ekstrak air keran yang direbus terlebih dahulu pada pH 7 menunjukkan nilai tertinggi dari kedua aktivitas proteolitik. Rasio berat limbah buah terhadap air sebesar 1:0,5 dan tingkat kematangan lebih dari 50% kulit kuning merupakan kondisi yang cocok untuk memperoleh nilai tertinggi dari kedua aktivitas tersebut. Kecernaan protein *in vitro* pakan udang yang diolah dengan bromelain kasar adalah  $68,68 \pm 2,70\%$ , yang menunjukkan peningkatan kemampuan pencernaan protein pada udang selama budidaya udang.

**Keterbatasan Penelitian:** Tidak tersedia alat penghancur kulit nanas yang sesuai. Oleh karena itu, fragmen setelah menghancurkan kulit tidak konsisten.

**Orisinalitas/nilai:** Bromelain mentah dapat diekstraksi dengan air keran dan digunakan untuk melengkapi pakan udang guna meningkatkan daya cerna.

**Kata kunci:** Bromelain kasar, Limbah buah nanas, Aktivitas proteolitik, Tahap kematangan, Air

### PERKENALAN

Thailand merupakan salah satu pengekspor buah nanas kalengan teratas di Asia, bersama dengan Indonesia dan Filipina. Sekitar 400.000 ton nanas kalengan dan produk lainnya seperti jus, konsentrat, dan pengawet dikirim ke seluruh dunia setiap tahunnya (Wattanakul et al., 2020).

Buah nanas yang digunakan dalam industri makanan dipisahkan menjadi bagian yang dapat dimakan yang mengandung daging buah dan bagian yang tidak dapat dimakan yang disebut limbah, termasuk kulit, mahkota dan inti. Kultivar nanas 'Smooth Cayenne' dengan kulit kuning, sekitar 40–90% dari buah utuh, sebagian besar digunakan untuk produksi

produk nanas di industri di Thailand, dan akibatnya, sejumlah besar kulit dan

<sup>1</sup>Divisi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Phetchaburi Rajabhat, Phetchaburi 76000, Thailand.

wiboonsirikul@yahoo.com

<sup>2</sup> Departemen Teknologi Pangan, Fakultas Teknik dan Teknologi Industri, Universitas Silpakorn, NaKhon Pathom 73000, Thailand.

<sup>3</sup> Divisi Akuakultur, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Phetchaburi Rajabhat, Phetchaburi 76000, Thailand.

<sup>10</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9519-5597>

Mahkota buah, yang mewakili lebih dari 40% limbah, dihasilkan setelah pengolahan. Sebagian besar limbah dijual sebagai pakan ternak dengan nilai yang rendah

(Ketnawa *et al.*, 2012). Saat ini, kebijakan zero waste biasanya diterapkan oleh banyak pengusaha dan industri untuk mengurangi biaya dan limbah.

Banyak industri nanas telah berupaya untuk menghasilkan produk bernilai tinggi dari limbah buah nanas. Buah nanas utuh, termasuk daging buah, kulit, inti, dan mahkota, mengandung bromelain dalam jumlah yang signifikan, yang merupakan enzim pencernaan terkenal yang digunakan dalam banyak industri makanan dan pakan. Beberapa penelitian telah menunjukkan aktivitas protease total beberapa kali lebih tinggi dalam ekstrak dari kulit dan mahkota nanas dibandingkan dari bagian daging buah dan inti (Ketnawa *et al.*, 2012; Aravind dan Gokulakrishnan, 2015; Sirijariyawat dan Nontaloon, 2020). Kondisi optimalisasi untuk ekstraksi bromelain dari limbah buah nanas telah diuji dalam banyak penelitian.

Jenis utama ekstraktan yang digunakan untuk ekstraksi bromelain mentah adalah air murni, air suling (Nadzirah *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2016) dan berbagai jenis buffer (Ketnawa *et al.*, 2012; Aravind dan Gokulakrishnan, 2015). Namun, larutan berair tersebut tidak praktis digunakan untuk petani udang dan pengusaha masyarakat karena mahal dan memerlukan proses hilir untuk menghilangkan garam tambahan. Penggunaan air ledeng yang diperoleh dari otoritas pekerjaan air provinsi setempat nyaman dan lebih praktis digunakan untuk petani akuatik. Namun, tidak ada laporan yang diterbitkan yang tersedia untuk menggunakan air ledeng sebagai ekstraktan untuk bromelain mentah dibandingkan dengan ekstraktan lainnya. Selain jenis ekstraktan, faktor lain dari ekstraksi bromelain mentah dari buah nanas memengaruhi aktivitas proteolitik, seperti pH ekstraktan dan tahap kematangan buah (Mohan *et al.*, 2016; Poba *et al.*, 2019). Selain itu, banyak penelitian yang melibatkan ekstraksi padat-cair melaporkan bahwa peningkatan rasio bahan limbah terhadap ekstraktan cenderung meningkatkan efisiensi ekstraksi (Perva-Uzunaliy *et al.*, 2006; Wiboonsirikul *et al.*, 2007).

Bungkil kedelai merupakan sumber protein alternatif dalam pakan udang. Petani udang di Thailand biasanya menggunakan bungkil kedelai sebagai pengganti sebagian pakan ikan.

bungkil kedelai karena harganya yang ekonomis, daya cerna yang relatif baik, dan komposisi asam amino yang seimbang (Sookying *et al.*, 2013). Saat ini, pakan udang mengandung sekitar 20–30% bungkil kedelai.

Namun, bungkil kedelai mengandung sejumlah komponen anti-nutrisi, termasuk lektin, asam fitat, dan penghambat protease, terutama penghambat tripsin kedelai (SBTI), yang menyebabkan rendahnya kemampuan udang dalam memanfaatkan nutrisi dan selanjutnya menurunkan laju pertumbuhan selama budidaya dibandingkan dengan sumber protein hewani lainnya.

Pemanfaatan protease alami yang diperoleh dari limbah pertanian, seperti bromelain, yang tersedia secara lokal dalam limbah buah nanas dari industri pengolahan buah nanas, merupakan cara alternatif untuk mengatasi hambatan dalam pemanfaatan bungkil kedelai dalam pakan udang tanpa meningkatkan biaya budidaya secara signifikan (Francis *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2020). Biaya pakan merupakan perhatian utama bagi petambak udang, dan biaya ini mewakili sekitar 50–60% dari total biaya variabel budidaya. Meskipun ada bromelain bubuk komersial yang tersedia di pasaran, biaya pakan budidaya udang akan meningkat jika digunakan. Selain itu, bromelain dari buah nanas tidak tersedia secara komersial (Larocca *et al.*, 2010), tetapi limbah buah nanas lebih mudah tersedia untuk industri produksi pakan dan budidaya perairan sebagai hasil dari banyaknya industri pengolahan buah nanas di Thailand.

Oleh karena itu, banyak petambak udang lebih suka memanfaatkan limbah buah dari industri nanas untuk ekstrak bromelain mentah dan menggunakannya langsung dalam pakan udang daripada bubuk bromelain komersial. Penelitian kami sebelumnya melaporkan kemungkinan pemanfaatan ekstrak bromelain kasar dari limbah buah nanas dalam pakan udang untuk berkontribusi pada pencernaan yang lebih baik oleh udang putih Pasifik selama budidaya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju pertumbuhan dan pemanfaatan pakan udang tidak meningkat secara signifikan pada volume 1–4% per konsentrasi berat pakan ekstrak limbah buah nanas. Selain itu, tingkat kelangsungan hidup dan pergantian kulit tidak meningkat secara signifikan pada konsentrasi ekstrak volume 2% per berat pakan (Klahan *et al.*, 2021b). Lebih lanjut, Yuangsoi *et al.* (2018) melaporkan bahwa penggunaan ekstrak limbah buah nanas untuk melengkapi pakan nila secara signifikan meningkatkan pencernaan pepsin.

tetapi tidak pada daya cerna protein. Akan tetapi, jarang ada penelitian tentang kondisi ekstraksi bromelain mentah yang melibatkan jenis air sebagai ekstrak selain air suling dan buffer, selain tingkat kematangan, dan rasio limbah buah nanas terhadap air. Berdasarkan sudut pandang yang disebutkan di atas, tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi kondisi ekstraksi bromelain mentah dari limbah buah nanas dan pengaruhnya terhadap daya cerna protein *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### *Bahan dan Bahan Kimia*

Buah nanas (*Ananas comosus* L.) dari kultivar 'Smooth Cayenne', pakan udang, dan bungkil kedelai dibeli dari pasar lokal di Distrik Banlard di provinsi Phetchaburi, Thailand sehari sebelum ekstraksi. Pakan udang (Integco®, Samutsakorn, Thailand) mengandung 38% protein kasar dan mengalami penghilangan lemak kasar dengan menggunakan ekstraksi eter minyak bumi. Semua bahan kimia dan reagen yang digunakan dalam percobaan adalah kelas analitis.

### *Pengolahan Limbah Buah Nanas*

Limbah nanas disiapkan dari kulit dan mahkota buah, yang dicuci bersih dengan air dan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%.

Buah nanas dikeringkan dengan udara pada suhu ruangan sebelum dikupas secara manual menggunakan bor nanas (diameter 80 mm). Limbah dipotong kecil-kecil sebelum digiling dalam penggiling (SKG PN-2562, Thailand). Berat buah nanas utuh dan limbah dicatat secara terpisah untuk mengevaluasi proporsi berat.

### *Persiapan Ekstrak Bromelain Kasar dari Limbah Buah Nanas*

Pertama, 200 g limbah buah nanas, termasuk kulit dan mahkota, dihancurkan bersama dengan 200 g air ledeng dingin atau air suling.

Campuran yang dihasilkan disaring melalui kain katun dan kemudian filtratnya disesuaikan dengan pH yang dipelajari yaitu 5, 6, 7, 8, dan 9 (disebut pH5, pH6, pH7, pH8, dan pH9) menggunakan natrium hidroksida (5 M) dan asam fosfat (5 M). Filtrat tanpa penyesuaian pH digunakan sebagai kontrol. Semua filtrat pada nilai pH yang berbeda disimpan pada suhu -18 °C hingga dilakukan analisis lebih lanjut. Pada hari analisis, filtrat beku dicairkan dan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit dengan menggunakan sentrifus berpendingin (MPW 260R, Korea). Supernatan setelah sentrifugasi adalah ekstrak bromelain kasar yang digunakan untuk evaluasi sifat fisik dan kimia yang dihasilkan dari jenis ekstrak air (air ledeng yang direbus terlebih dahulu atau air suling) dan pH yang disesuaikan.

Berbagai rasio berat limbah buah nanas terhadap air terpilih dipelajari pada 1:0,25, 1:0,50, 1:0,75, dan 1:1 (b/b). Berbagai tahap kematangan berdasarkan persentase kulit kuning-oranye dan hijau, termasuk kulit hijau sepenuhnya (FGP), kulit kuning kurang dari 50% (LYP), kulit kuning lebih dari 50% (MYP), dan kulit kuning sepenuhnya (FYP), juga dipelajari. Limbah dan air dihancurkan, disaring, disimpan dalam freezer, dan disentrifugasi sesuai dengan prosedur di atas untuk mendapatkan ekstrak bromelain mentah pada berbagai rasio berat limbah buah dan air, serta berbagai tahap kematangan.

**Pengukuran Fisika dan Kimia****Sifat Jenis Air Sebagai Ekstraktan**

Air keran dingin yang direbus terlebih dahulu dan air suling yang digunakan untuk ekstraksi bromelain mentah dievaluasi sifat fisik dan kimianya, termasuk pH, total padatan terlarut dan konsentrasi garam (ppm), berat jenis, konduktivitas listrik ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), dan potensial redoks (mV) dengan menggunakan pengujian kualitas air (Juanjuan, Cina).

**Pengukuran Warna Kulit Buah Nanas**

Tingkat kematangan yang berbeda (FGP, LYP, MYP, dan FYP) diukur dengan mengevaluasi nilai kroma kulit buah setelah pengolahan limbah buah nanas menggunakan kolorimeter (WR 18 FRU, Cina). Sepuluh lembar kulit buah dari setiap tingkat kematangan dipilih secara acak untuk mengukur nilai warna L, a, dan b pada permukaan kulit buah. Nilai kroma dihitung menggunakan persamaan (1).

$$Kroma = (a^2 + b^2)^{1/2} \dots\dots\dots(1)$$

**Pengukuran Aktivitas Proteolitik pada Ekstrak**

Aktivitas proteolitik ekstrak bromelain mentah dievaluasi menurut metode yang diusulkan oleh Ketnawa *et al.*, (2012) dengan sedikit modifikasi. Kasein digunakan sebagai substrat.

Secara singkat, 0,5-1,0 mL ekstrak dicampur dengan 1 mL larutan reaksi yang mengandung 1% (b/v) kasein, 0,03 mol/L sisteina, 0,006 mol/L EDTA dalam 0,05 mol/L buffer fosfat pada pH 7,0, yang baru disiapkan untuk analisis. Reaksi enzimatis dilakukan pada suhu 37 °C selama 10 menit dan kemudian dihentikan dengan penambahan 3 mL asam trikloroasetat 5% (b/v). Blanko disiapkan dengan mencampur volume ekstrak yang sama dengan asam trikloroasetat 5% (b/v) sebelum penambahan kasein. Campuran reaksi dan blanko disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit, dan supernatan digunakan untuk merekam nilai absorbansi pada 275 nm sebagai larutan

tirosin dan peptida yang tidak terendapkan diperoleh dari pencernaan enzimatis kasein. Pengenceran serial L-tirosin dievaluasi pada absorbansi yang sama dengan standar. Aktivitas proteolitik (unit/mL) dihitung dengan persamaan (2) (Mohan *et al.*, 2016):

$$Aktivitas\ proteolitik = (TE \times DF)/(V \times t) \dots\dots\dots(2)$$

Di mana,

$TE$  = ekuivalen tirosin yang dilepaskan ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),

$DF$  = faktor pengenceran,

$V$  = volume ekstrak bromelain kasar

digunakan (mL),

$t$  = waktu reaksi pengujian (menit).

Aktivitas spesifik proteolitik (unit/min.mg) ekstrak bromelain kasar dihitung dengan persamaan (3).

$$Aktivitas\ proteolitik\ spesifik = aktivitas\ proteolitik / \text{kandungan protein} \dots\dots\dots(3)$$

**Pengukuran Kandungan Protein Total**

Kandungan protein dalam ekstrak bromelain mentah dievaluasi menurut metode protein Bradford (Bradford, 1976). Bovine serum albumin (BSA) digunakan sebagai standar untuk pengenceran serial.

**Pengukuran Kandungan Karbohidrat Total**

Kandungan karbohidrat total dalam ekstrak bromelain mentah diukur menurut metode fenol-sulfat (Dubois *et al.*, 2002). Glukosa digunakan sebagai standar untuk pengenceran serial.

**Pengukuran pH dan Total Soluble Solid**

pH nyata dan total padatan terlarut (o Brix) diukur menggunakan pH meter.

(Ohaus ST20, AS) dan refraktometer tangan (Atago N1, Jepang).

**Pengukuran Daya Cerna Protein In Vitro pada Pakan Bungkil Kedelai dan Udang yang Diolah dengan Ekstrak Bromelain Kasar**

Bungkil kedelai komersial yang dihilangkan lemaknya (SBM) dan pakan udang dengan ukuran partikel 1,5 mm yang diolah terlebih dahulu dengan ekstrak bromelain kasar (PTSF) dievaluasi untuk pencernaan protein *in vitro*.

PTSF dibuat dengan merendam pakan udang dengan ekstrak bromelain kasar berdasarkan

Kandungan protein ekstrak untuk memperoleh 0,8 g/g protein untuk pakan dan kemudian dikeringkan dalam desikator selama beberapa hari sebelum pengukuran pencernaan protein *in vitro*. SBM dan PTSF dikenakan ekstraksi protein menurut Fageer dan El-Tinay (2004), dengan sedikit modifikasi. Secara singkat, 2 g SBM dan PTSF dicampur dengan 20 mL buffer fosfat 0,1 mol/L pada berbagai nilai pH 6,0, 7,0, 8,0, dan 9,0 dalam beberapa labu Erlenmeyer dan kemudian diinkubasi pada 30 °C dalam pengocok yang suhunya terkontrol (WiseCube, Korea) pada 90 rpm/menit selama 16 jam. Setelah inkubasi, supernatan setiap labu, yang berisi protein terlarut, ditarik ke dalam dua tabung plastik. Tabung pertama dievaluasi kandungan proteinnya sebelum pencernaan dengan mengikuti metode Bradford (Bradford, 1976). Yang kedua mengalami pencernaan dengan mencampur 1 mL supernatan, 2 mL ekstrak bromelain kasar, dan 20 mL buffer fosfat secara menyeluruh pada nilai pH yang sama dengan ekstraksi protein seperti yang disebutkan di atas. Setelah inkubasi

pada suhu yang berbeda yaitu 25, 30, atau 40 °C selama 24 jam, supernatan dari setiap tabung dievaluasi kandungan protein terlarutnya. Daya cerna protein *in vitro* dari ekstrak bromelain kasar dihitung dengan persamaan (4).

$$\text{Daya cerna protein (\%)} = [(SP1 + EP) - SP2] / SP1 \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Di mana,

SP1 = kandungan protein dalam protein terlarut sebelum

penambahan ekstrak bromelain kasar,

SP2 = kadar protein dalam protein terlarut setelah penambahan ekstrak bromelain kasar,

EP = kandungan protein dalam bromelain kasar ekstrak.

**Analisis Statistik**

Analisis rangkap tiga dilakukan untuk setiap pengukuran, dan data dinyatakan sebagai rata-rata ± galat baku.

Perbedaan rata-rata antarperlakuan dievaluasi dengan analisis varians (ANOVA) diikuti oleh uji rentang berganda Duncan pada tingkat signifikansi  $p < 0,05$  menggunakan R versi 4.1.2 (Tim Inti R, 2021).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Proporsi Berat Limbah Buah Nanas**

Rata-rata proporsi berat limbah, termasuk kulit dan mahkota terhadap buah nanas utuh adalah sekitar 30,31–40,62% (b/b), yang mendekati yang diperoleh dari laporan peneliti lain untuk kultivar 'Smooth Cayenne' (Mulyono *et al.*, 2013; Sirijariyawat dan Nontaloon, 2020). Sisa buah nanas, yang mengandung pulp dan inti, tidak digunakan untuk ekstraksi bromelain kasar karena pulp digunakan dalam pengolahan nanas untuk berbagai produk, dan bagian inti mengandung kadar serat yang sangat tinggi dan aktivitas proteolitik beberapa kali lebih rendah daripada kulit dan mahkota (Prakongpan *et al.*, 2002; Ketnawa *et al.*, 2012; Sirijariyawat dan Nontaloon, 2020; Abbas *et al.*, 2021). Proporsi berat setiap bagian dalam buah nanas bervariasi menurut ukuran dan varietasnya.

Semakin besar ukuran buah, semakin besar pula bagian yang dapat dimakan (Ketnawa *et al.*, 2012; Sirijariyawat dan Nontaloon, 2020).

**Sifat Fisika dan Kimia Hasil Sulingan Air dan Air Keran yang Sudah Direbus**

Dua jenis air sebagai ekstrak, yaitu air suling dan air ledeng yang telah direbus, digunakan untuk mengekstrak bromelain kasar dari limbah buah nanas. Sifat fisik dan kimia air suling dan air ledeng yang telah direbus ditunjukkan pada Tabel 01.

Air keran yang direbus terlebih dahulu menunjukkan konsentrasi garam dan konduktivitas listrik yang lebih tinggi tetapi nilai pH dan potensial redoks yang lebih rendah daripada air suling. Total padatan terlarut dan berat jenis air keran yang direbus terlebih dahulu setara dengan air suling.

Berdasarkan konsentrasi garam dan konduktivitas listrik, air keran yang direbus terlebih dahulu mengandung konsentrasi ion anorganik yang lebih tinggi yang dapat menghantarkan listrik daripada air suling. Ion-ion umum dalam air yang menghantarkan arus listrik meliputi natrium, klorida, karbonat, kalsium, dan magnesium (Damo dan Icka, 2013; Otoritas Air Provinsi, 2022).

Potensial redoks negatif dari air keran yang direbus terlebih dahulu menunjukkan konsentrasi oksigen terlarut dan karbon dioksida yang lebih rendah daripada air suling karena air tidak direbus terlebih dahulu sebelum digunakan (Raÿys *et al.*, 2010). Selain itu, pH kedua air menunjukkan bahwa air suling sedikit basa dan air keran yang direbus terlebih dahulu sedikit asam.

**Pengaruh Jenis Air Sebagai Ekstraktan dan Penyesuaian pH terhadap Sifat Kimia Minyak Mentah Ekstrak Bromelain**

Setelah ekstraksi dengan kedua jenis air dan penyaringan, pH filtrat disesuaikan dari 5 hingga 9 serta kontrol tanpa penyesuaian pH sebelum disimpan dalam freezer. Semua larutan ekstrak kasar disentrifugasi, dan supernatan, sebagai ekstrak bromelain kasar, dievaluasi untuk sifat kimia, termasuk pH nyata, total padatan terlarut, kandungan protein dan karbohidrat total, dan aktivitas proteolitik umum dan khusus. Hasilnya disajikan dalam Tabel 02 dan Tabel 03.

Nilai pH yang tampak mendekati nilai pH yang telah disesuaikan dari ekstrak bromelain mentah yang sama yang diperoleh dari air suling dan air keran, tetapi pH ekstrak bromelain mentah yang disesuaikan sebesar 9 menunjukkan sedikit penurunan pada pH yang tampak setelah pembekuan dan pencairan, yang dapat dikaitkan dengan keasaman bromelain buah mentah (Ramli *et al.*, 2018). Nilai pH ekstrak bromelain mentah tanpa penyesuaian (kontrol) yang diperoleh dari ekstraksi dengan kedua jenis air adalah 4,4–4,5, yang sedikit lebih tinggi daripada nilai pH ekstrak yang dilaporkan oleh peneliti lain. Bartolome *et al.*, (1995) melaporkan bahwa nilai pH ekstrak kulit nanas dari kultivar 'Smooth Cayenne' adalah sekitar 3,54, sementara Ketnawa *et al.* (2012) melaporkan bahwa nilai pH sekitar 4,0 untuk ekstrak kulit dan sekitar 4,8–5,19 untuk ekstrak mahkota.

**Tabel 01: Sifat fisika dan kimia air suling dan air keran yang sudah direbus.**

Sifat fisika dan kimia	Air suling	Air keran yang sudah direbus
	8,62±0,10	6,60±0,05
Jumlah padatan terlarut (mg/L)	---	---
Konsentrasi garam (mg/L)	---	133±3,51
Berat jenis	1.001	1.001
Konduktivitas listrik (µS/cm)	(1,00±0,05)×10-4	(271±4,04)×10-4
Potensial redoks (mV)	30,7±2,52	-95,7±2,08



**Tabel 02: Sifat kimia ekstrak bromelain kasar yang diperoleh dari ekstraksi limbah buah nanas yang dihancurkan bersama dengan air suling pada berbagai nilai pH.**

pH ekstrak yang disesuaikan	pH tampak	Total padatan terlarut (o Brix)	Aktivitas proteolitik (Unit/mL)	Aktivitas proteolitik spesifik (Satuan/mg)	Total kandungan protein <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>	Total kandungan karbohidrat <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>
kontrol	4,40±0,50	4,2±0,10b	4,11±0,10b	13,09±0,31a	0,31±0,01e	22,54±0,23c
pH5	4,96±0,10	4,4±0,05a	4,92±0,26a	13,52±0,73a	0,36±0,01dtk	24,85±0,10b
pH6	6,05±0,05	4,3±0,05 ab	5,01±0,12a	10,48±0,26b	0,48±0,03c	25,49±0,20a
pH7	6,88±0,05	4,4±0,05a	5,17±0,24a	3,76±0,18c	1,38±0,09b	24,61±0,36b
pH8	8,01±0,10	4,5±0,10a	5,08±0,15a	3,14±0,09c	1,61±0,10ab	24,56±0,13b
pH9	8,65±0,10	4,5±0,10a	5,17±0,12a	12,91±0,31a	0,46±0,10cd	25,67±0,41a

Data yang disajikan dalam Tabel 02 menunjukkan rata-rata  $\pm$  standar error. Superskrip yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan di antara pH ekstrak yang disesuaikan dengan uji rentang ganda Duncan pada  $p < 0,05$ .

**Tabel 03: Kandungan kimia ekstrak bromelain kasar diperoleh dari ekstraksi limbah buah nanas yang dihancurkan dengan air ledeng yang direbus pada berbagai nilai pH.**

pH ekstrak yang disesuaikan	pH tampak	Total padatan terlarut (o Brix)	aktivitas proteolitik (unit/mL)	Aktivitas proteolitik spesifik (satuan/mg)	Total kandungan protein <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>	Kandungan karbohidrat total <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>
kontrol	4,58±0,15	4,2±0,10	7,16±0,02b	22,04±0,55b	0,32±0,01b	27,53±0,27c
pH5	5,10±0,10	4,4±0,10	8,32±0,08a	20,92±0,20c	0,40±0,01a	27,91±0,21c
pH6	6,07±0,08	4,5±0,10	8,11±0,05a	21,61±0,13 SM	0,37±0,00a	31,63±0,96a
pH7	7,05±0,10	4,5±0,10	8,07±0,03a	24,22±0,80a	0,33±0,02b	29,83±1,11b
pH8	7,92±0,08	4,3±0,10	4,35±0,02 hari	15,44±0,78e	0,28±0,03c	27,83±0,24c
pH9	8,75±0,15	4,0±0,10	4,69±0,01c	18,08±0,57 hari	0,26±0,03c = 0,26	27,46±0,33c

Data yang disajikan dalam Tabel 03 menunjukkan nilai rata-rata  $\pm$  standar error. Superskrip yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan di antara pH ekstrak dengan uji rentang ganda Duncan pada  $p < 0,05$ .

Perbedaan pH ekstrak bergantung pada beberapa parameter, seperti tingkat kematangan, kultivar, bagian nanas yang diekstraksi, dan jumlah asam organik dalam limbah nanas (Ketnawa *et.al*, 2012). Total padatan terlarut dari ekstrak bromelain mentah pada semua nilai pH yang disesuaikan, termasuk kontrol yang diperoleh dari ekstraksi dengan kedua jenis air, adalah 4,0–4,5 o Brix. Sedikit perbedaan dalam kandungan padatan terlarut total dari setiap ekstrak terutama bergantung pada kandungan karbohidrat terlarut dari ekstrak limbah nanas dan kandungan minor lainnya dari protein terlarut, asam, dan mineral.

sesuai dengan refraktometer. Total kandungan protein dan karbohidrat dari semua ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi air suling adalah

0,31–1,61 dan 22,54–25,67 mg/mL, dan yang diperoleh dari ekstraksi air keran yang direbus terlebih dahulu adalah 0,26–0,40 dan 27,46–31,63 mg/mL. mL, masing-masing.

Jenis air mempengaruhi ketersediaan aktivitas proteolitik, aktivitas spesifik dan kandungan protein ekstrak. Ekstraksi dengan

air keran menunjukkan aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik yang lebih tinggi, total protein dan

kandungan karbohidrat lebih tinggi dibandingkan dengan air suling. Aktivitas proteolitik ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi dengan air suling dan air ledeng yang telah direbus sebelumnya masing-masing adalah 4,11–5,17 dan 4,35–8,32 unit/mL, yang sesuai dengan laporan dari peneliti lain (Mohan *et al.*, 2016). Namun, beberapa peneliti melaporkan aktivitas proteolitik ekstrak dari limbah buah nanas yang lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian ini (Ketnawa *et al.*, 2012; Mulyono *et al.* 2013). Perbedaan aktivitas proteolitik mungkin disebabkan oleh kultivar, tingkat kematangan, dan ukuran buah nanas yang digunakan untuk ekstraksi (Mulyono *et al.*, 2013). Untuk air suling sebagai ekstraktan, ekstrak pada pH yang disesuaikan 5 dan 9 menunjukkan aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik tertinggi, sedangkan untuk air ledeng yang direbus terlebih dahulu sebagai ekstraktan, ekstrak pada pH yang disesuaikan 7 menunjukkan aktivitas tertinggi ( $p < 0,05$ ). Perlu dicatat bahwa ekstrak yang diperoleh dari air ledeng yang direbus terlebih dahulu pada pH yang disesuaikan 7 menunjukkan aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik yang lebih tinggi daripada yang menggunakan air suling ( $p$

$< 0,05$ ). Selain itu, dengan mempertimbangkan hubungan antara aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik serta kandungan protein, semakin tinggi aktivitas proteolitik dan semakin rendah kandungan protein, semakin tinggi aktivitas spesifik yang diperoleh. Proporsi terbalik antara aktivitas proteolitik spesifik dan kandungan protein dalam ekstrak bromelain mentah berasal dari peptidase dan protein lain selain bromelain, seperti fosfatase, glukosidase, peroksidase, selulase, dan glikoprotein (Bhattacharyya, 2008). Selain itu, bromelain buah menunjukkan kemampuan luas untuk pembelahan protein dan stabilitas dalam rentang pH yang luas dari 3 hingga 8 (Mohapatra *et al.*, 2013; Manzoor *et al.*, 2016). Perubahan aktivitas proteolitik spesifik dan kandungan protein menurut pH dan jenis air dapat dikaitkan dengan ketersediaan ion, seperti kalsium dan magnesium, dalam air keran yang direbus sebelumnya yang digunakan untuk ekstraksi. Air keran yang direbus terlebih dahulu mengandung kalsium dan magnesium, beserta klorida masing-masing sekitar 300 dan 250 mg/L (Badan Pengelola Air Provinsi, 2022). Keberadaan kalsium, magnesium, atau kalsium klorida sebagai indikator

aktivator atau agen stimulasi pada 0,1 mmol/L meningkatkan aktivitas proteolitik bromelain sekitar dua kali lebih tinggi dibandingkan tanpanya (Fadhilah *et al.*, 2018; Chakraborty *et al.*, 2021).

### **Pengaruh Perbandingan Berat Buah Nanas Limbah Menjadi Air Berdasarkan Sifat Kimia Minyak Mentah Ekstrak Bromelain**

Ekstrak bromelain kasar yang diperoleh dari Ekstraksi dengan air ledeng yang telah direbus terlebih dahulu dan pH-nya disesuaikan menjadi 7 dipilih untuk menyelidiki lebih lanjut pengaruh berbagai rasio berat limbah buah nanas terhadap air dari 1:0,25 hingga 1:1 terhadap sifat kimianya. Sifat-sifat ekstrak bromelain kasar. Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 04.

Nilai pH ekstrak setelah sentrifugasi pada semua rasio berat limbah dan air tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ). Peningkatan rasio buah

Konversi limbah buah ke air meningkatkan total padatan terlarut, aktivitas proteolitik, kandungan protein, dan karbohidrat dalam ekstrak ( $p < 0,05$ ). Namun, aktivitas proteolitik spesifik, dalam ekstrak yang diperoleh dari rasio buah yang berbeda

limbah terhadap air tidak berbeda secara signifikan ( $p > 0,05$ ). Terlihat bahwa peningkatan total karbohidrat dan kandungan protein berhubungan dengan peningkatan proporsional pada total padatan terlarut dan aktivitas proteolitik. Mempertimbangkan aktivitas proteolitik umum yang jauh lebih tinggi dan aktivitas proteolitik spesifik yang berbeda tidak signifikan, ekstrak yang diperoleh dari rasio limbah terhadap air pada 1:0,5 dipilih untuk melanjutkan

Penelitian tentang pengaruh tingkat kematangan terhadap sifat kimia ekstrak bromelain kasar. Selain itu, keterbatasan ketersediaan air pada perbandingan berat limbah terhadap air sebesar 1:0,25 menyebabkan ukuran fragmen tidak konsisten dan bromelain kasar dari fragmen besar limbah buah setelah dihancurkan dengan air tidak terekstraksi.



**Tabel 04:** Karakteristik ekstrak bromelain kasar yang diperoleh dari ekstraksi pada berbagai rasio limbah buah nanas dan air ledeng yang direbus terlebih dahulu.

Rasio limbah terhadap air (b/b)	pH tampak	Total padatan terlarut (o Brix)	aktivitas proteolitik (unit/mL)	Aktivitas proteolitik spesifik (satuan/mg)	Total kandungan protein <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>	Kandungan karbohidrat total <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>
skala 1:0,25	6,88±0,07a	5,83±0,06a	12,01±0,39a	24,24±0,79a	0,50±0,02a	32,25±0,46a
skala 1:0,50	7,03±0,08a	5,40±0,00b	11,42±0,43a	23,96±0,90a	0,48±0,01ab	31,73±0,16a
skala 1:0,75	6,85±0,05a	4,60±0,05c	10,74±0,19b	23,59±0,42a	0,45±0,02b	25,22±0,84b
1:1	6,99±0,08a	3,63±0,06 hari	10,26±0,16b	24,98±0,39a	0,41±0,01c	19,69±0,10c

Data yang disajikan dalam Tabel 04 menunjukkan rata-rata ± standar error. Superskrip yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam rasio limbah terhadap air dengan uji rentang berganda Duncan pada  $p < 0,05$ .

**Tabel 05:** Karakteristik ekstrak bromelain kasar yang diperoleh dari ekstraksi limbah nanas pada berbagai tahap kematangan.

Tahap kematangan	pH tampak	Total padatan terlarut (o Brix)	Aktivitas proteolitik (unit/mL)	Aktivitas proteolitik spesifik (unit/mg)	Total kandungan protein <small>Jumlah zat terlarut (mg/ml)</small>	Kandungan karbohidrat total (mg/mL)
FGP	6,88±0,04a	5,08±0,03a	7,76±0,24a	17,59±0,54b	0,44±0,01a	32,72±0,05c
mengemis	6,95±0,05a	5,42±0,03b	7,13±0,24b	20,97±0,71a	0,34±0,02c	36,91±0,10b
MYP	6,85±0,04a	6,18±0,03c	7,95±0,15a	19,73±0,37a	0,40±0,01b	42,17±0,47a
FYP	6,93±0,03a	6,40±0,05 hari	3,93±0,51c	10,25±1,34c	0,38±0,01c	41,95±0,62a

Data yang disajikan dalam Tabel 05 menunjukkan rata-rata ± standar error. Superskrip yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan di antara tahap kematangan dengan uji rentang ganda Duncan yang baru pada  $p < 0,05$ . Singkatan: FGP, ekstrak kulit hijau sepenuhnya; LYP, ekstrak kulit kuning kurang dari 50%; MYP, ekstrak kulit kuning lebih dari 50%; FYP, ekstrak kulit kuning sepenuhnya.

### Pengaruh Tahapan Kematangan terhadap Kimia Sifat Ekstrak Bromelain Mentah

Sifat kimia ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi limbah buah nanas pada berbagai tingkat kematangan dengan air ledeng yang telah direbus terlebih dahulu dan diatur pH-nya hingga 7, ditunjukkan pada Tabel 05.

Perbedaan warna kekuningan kulit buah nanas berdasarkan pengamatan mata manusia merupakan salah satu parameter untuk membedakan tingkat kematangan (Wang dan Chai, 2022). Kulit buah nanas yang berwarna hijau sepenuhnya menunjukkan buah nanas yang belum matang tetapi sudah matang sempurna. Sebaliknya, kulit buah nanas yang berwarna kuning 100% menunjukkan buah nanas yang sudah matang sempurna. Peningkatan persentase kulit buah yang berwarna kuning mulai dari bagian bawah hingga bagian atas buah menunjukkan perkembangan kematangan ke arah penuaan atau kematangan yang berlebihan (Assumi *et al.*, 2021).

Tahapan kematangan buah nanas yang dipilih didasarkan pada persentase kulit kuning. Ekstrak bromelain kasar yang diperoleh dari limbah buah dengan kulit hijau penuh, kulit kuning kurang dari 50%, kulit kuning lebih dari 50%, dan kulit kuning penuh masing-masing direpresentasikan dengan FGP, LYP, MYP, dan FYP. Nilai kroma FGP, LYP, MYP, dan FYP masing-masing adalah 28,69±2,68, 70,43±15,70, 99,37±5,46, dan 124,69±14,02. Peningkatan nilai kroma kulit nanas merupakan salah satu indeks perbedaan tingkat kematangan buah nanas (Ullah, *dkk.*, 2018). Nilai pH nyata dari masing-masing ekstrak yang diperoleh dari tingkat kematangan limbah buah nanas yang berbeda tidak berbeda nyata, tetapi total padatan terlarut dan kandungan karbohidrat ekstrak meningkat nyata dengan persentase kulit kuning ( $p < 0,05$ ), yang sesuai dengan

dengan laporan Kumara dan Hettigh (2020), dimana peningkatan total padatan terlarut dalam ekstrak dari semua bagian buah nanas, kecuali bagian inti, merupakan fungsi dari peningkatan persentase kulit kuning. Di sisi lain, kandungan protein ekstrak tidak bergantung pada peningkatan persentase kulit kuning.

Aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik tertinggi dan terendah masing-masing diperoleh dari MYP dan FYP ( $p < 0,05$ ). Akan tetapi, aktivitas ekstrak FGP, LYP, dan MYP tersebut hanya sedikit berbeda satu sama lain.

Aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik terendah, serta kandungan protein FYP, dikaitkan dengan pematangan dan penuaan buah yang melibatkan proteolisis dan katabolisme protein (Koia *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2020). Koia *et al.* (2012) melaporkan bahwa aktivitas bromelain pada buah menurun saat nanas matang dari kulit hijau menjadi buah kulit kuning. Selain itu, limbah buah nanas dengan kulit kuning kurang dari 50% dan kulit kuning lebih dari 50% melimpah sebagai produk sampingan dari industri pengolahan nanas.

Untuk alasan yang disebutkan di atas dan aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik pada Tabel 05, buah nanas dengan tahap kematangan kurang dari 50% kulit kuning atau lebih dari 50% kulit kuning digunakan untuk ekstraksi bromelain kasar guna mengevaluasi pencernaan bungkil kedelai dan pakan udang *secara in vitro*.

### **Pengaruh Suhu dan pH Inkubasi**

#### **Nilai Pakan Udang yang Ditambah dengan Pakan Kasar Bromelain pada Daya Cerna Protein secara In Vitro**

Kecernaan protein *in vitro* dari bungkil kedelai (SBM) dan pakan udang yang diolah terlebih dahulu (PTSF) dengan ekstrak bromelain kasar ditunjukkan pada Tabel 06.

PTSF terdiri dari SBM dan pakan udang, yang diolah terlebih dahulu dengan ekstrak bromelain kasar sebelum analisis daya cerna protein *in vitro*. Pakan udang yang digunakan untuk pengolahan awal mengandung tepung ikan dan hidrolisat, pasta hati, tepung gandum, biji-bijian atau tanaman pangan, minyak ikan, dan berbagai aditif pakan, seperti pengikat, sinbiotik, dan antioksidan (Prachom,

2022). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya cerna protein *in vitro* SBM dan PTSF bervariasi dari  $28,56 \pm 0,17$  hingga  $89,31 \pm 1,19\%$  dan dari  $33,64 \pm 0,97$  hingga  $68,68 \pm 2,70\%$ . Sementara daya cerna protein *in vitro* SBM meningkat dengan meningkatnya pH, daya cerna protein PTSF menurun dengan meningkatnya pH ( $p < 0,05$ ). Perlu dicatat bahwa pada suhu inkubasi yang sama, daya cerna protein *in vitro* SBM dan PTSF menunjukkan nilai tertinggi pada pH yang berbeda, masing-masing 9 dan 6. Suhu inkubasi 25–40°C memiliki sedikit efek pada daya cerna protein *in vitro*.

Klahan *et al.* (2021a) melaporkan bahwa *in vitro* Kecernaan protein pada nilai lebih tinggi dari 50% dapat meningkatkan pencernaan protein selama budidaya udang. Terlepas dari suhu inkubasi dan pH, kecernaan protein *in vitro* PTSF ( $28,56 \pm 0,17$  hingga  $89,31 \pm 1,19\%$ ) lebih tinggi daripada pakan udang ( $4,27 \pm 0,29$  hingga  $63,22 \pm 1,58\%$ ) pada ukuran partikel yang sama ( $p < 0,05$ ).

Selain itu, daya cerna protein *in vitro* dari PTSF dan pakan udang menunjukkan nilai tertinggi yang sama pada pH yang sama yaitu 6. Hal ini mungkin karena PTSF dicerna terlebih dahulu sebelum pengukuran daya cerna protein *in vitro*, karena pembengkakan partikel pakan diamati selama perendaman, yang menunjukkan pencernaan protein dibandingkan dengan partikel pakan yang tidak membengkak selama perendaman dalam air suling, seperti yang dilaporkan oleh Jintanawit *et al.*, (2004). Selain itu, PTSF mengandung komposisi lain, seperti protein hidrolisat, minyak, pati, dan beberapa aditif selain SBM, yang dapat memengaruhi aktivitas proteolitik ekstrak bromelain mentah. Corzo *et al.* (2012) melaporkan bahwa aktivitas proteolitik bromelain buah bergantung pada jenis substrat, termasuk azocasein, kasein, azoalbumin, dan hemoglobin. Setiap substrat individu memiliki pH optimal yang berbeda yang bervariasi dari 2,9 hingga 7,7 dan suhu optimal bervariasi dari 37 hingga 59°C untuk aktivitas proteolitik. Pakan udang yang dilengkapi dengan ekstrak bromelain kasar bermanfaat tidak hanya untuk pencernaan protein, tetapi juga untuk kinerja pertumbuhan, pemanfaatan pakan, dan stimulasi pergantian bulu pada hewan air, seperti yang dilaporkan oleh peneliti lain (Choi *et al.*, 2016; Klahan *et al.*, 2021b).

**Tabel 06:** Kecernaan protein *in vitro* (%) dari bungkil kedelai dan pakan udang yang diolah dengan ekstrak bromelain kasar pada suhu inkubasi (T) dan nilai pH yang berbeda.

T [o C]		Kecernaan protein <i>in vitro</i> (%)	
		MBS	PTSF
25	6	43,47±1,20 g/jam	68,68±2,70c
	7	55,91±1,35c	58,52±1,41 dari
	8	46,70±3,55	58,87±1,74derajat
	9	89,31±1,19a	47,74±2,11 gram
30	6	28,56±0,17j	54,28±3,51
	7	48,65±2,44e	32,92±2,83tinggi
	8	48,14±1,55e	30,16±1,29
	9	87,84±3,04a	33,64±0,97tinggi
40	6	34,00±2,01i	48,11±2,07 gram
	7	40,60±1,01 jam	50,13±1,77fg
	8	42,08±3,01gh	61,41±1,01 hari
	9	78,74±1,95b	35,41±0,29 jam

Data yang disajikan dalam Tabel 06 menunjukkan rata-rata  $\pm$  standar error. Superskrip yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan antara suhu inkubasi dan pH dengan uji rentang ganda Duncan pada  $p < 0,05$ .

Selain itu, air di tambak udang yang diberi pakan yang mengandung bromelain menunjukkan kualitas yang lebih baik dengan mengurangi nitrogen amonia (Klahan *et al.*, 2020). Selain itu, ukuran partikel pakan udang tampaknya memengaruhi daya cerna protein.

Semakin besar ukuran partikel, semakin rendah *in vitro* kecernaan protein pakan udang yang diberi ekstrak bromelain kasar adalah. (Klahan *et al.*, 2021a).

## KESIMPULAN

Ekstraksi bromelain mentah yang sesuai dari limbah buah nanas diteliti. Temuan keseluruhan menunjukkan bahwa air ledeng yang direbus terlebih dahulu atau air suling dapat digunakan untuk memperoleh ekstrak bromelain kasar pada pH yang disesuaikan menjadi 7 dengan nilai aktivitas proteolitik dan proteolitik spesifik yang sedikit berbeda. Rasio limbah buah nanas terhadap air yang sesuai adalah 1 hingga 0,50 berat dan tingkat kematangan optimal adalah lebih dari 50% kulit kuning untuk memperoleh nilai aktivitas proteolitik tertinggi.

nilai dari kedua aktivitas tersebut. Ekstrak bromelain kasar diaplikasikan pada bungkil kedelai dan pakan udang untuk mengetahui daya cerna protein *in vitro* -nya . Pakan udang yang diolah terlebih dahulu dengan ekstrak bromelain kasar menunjukkan daya cerna protein *in vitro* tertinggi pada pH 6 dan suhu inkubasi 25 o C, dan bungkil kedelai menunjukkan daya cerna protein *in vitro* tertinggi pada pH 9 dan suhu inkubasi 25 o C. Akibatnya, dimungkinkan untuk menggunakan air ledeng untuk mengekstrak bromelain kasar dari limbah buah nanas, pada rasio berat limbah terhadap air dan tahap kematangan yang sesuai, dan mengaplikasikannya pada pakan udang untuk budidaya udang guna mengurangi biaya pakan.

## Pernyataan Ketersediaan Data

Kumpulan data kecernaan protein *in vitro* dari pakan udang untuk analisis perbandingan rata-rata antara pakan udang dan PTSF tersedia dari rekan penulis (Klahan, R.) atas permintaan yang wajar.

**PENGAKUAN****Konflik Kepentingan**

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan finansial dari Thailand Science Research and Innovation (TSRI) dan ingin mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Teknologi Pertanian karena telah menyediakan fasilitas untuk melaksanakan penelitian ini.

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

**REFERENSI**

- Abbas, S., Shanbhag, T. dan Kothare, A. (2021). Aplikasi bromelain dari limbah nanas untuk mengatasi jerawat. *Jurnal Ilmu Biologi Saudi*. 28(1), 1001–1009. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.032>.
- Aravind, KV dan Gokulakrishnan, M. (2015). Ekstraksi, pemurnian bromelain dari nanas dan penentuan efeknya terhadap bakteri penyebab periodontitis. *Jurnal Internasional Ilmu Farmasi dan Penelitian*. 6(12), 5284–5294. DOI: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(12\).5284-94](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(12).5284-94).
- Assumi, SR, Singh, PT dan Jha, AK (2021). Nanas (*Ananas comosus* L. Merr.). Dalam: Tanaman Buah Tropis: Teori hingga Praktik. (Ghosh, SN dan Sharma, RR Eds). Jaya Publishing House, New Delhi, India. 487–541.
- Bae, J., Hamidoghli, A., Djaballah, MS, Maamri, S., Hamdi, A., Souffi, I., Farris, N.W. dan Bai, SC. (2020). Efek tiga sumber protein nabati berbeda sebagai pengganti tepung ikan pada udang putih muda, *Litopenaneus vannamei*. *Perikanan dan Ilmu Perairan*. 23(2), 1–6. DOI: <http://doi.org/10.1186/s41240-020-0148-x>.
- Bartolome, AP, Ruperez, P. dan Fuster, C. (1995). Karakteristik morfologi buah nanas, komposisi kimia dan analisis sensori kultivar Red Spanish dan Smooth Cayenne. *Kimia Pangan*. 53, 75–79. DOI: [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)95790-D](http://doi.org/10.1016/0308-8146(95)95790-D).
- Bhattacharyya, BK (2008). Bromelain: gambaran umum. *Natural Product Radiance*. 7(4), 359–363. Diambil dari <https://www.semanticscholar.org/paper/Bromelain%3A-An-Overview-Bhattacharyya/4a4dfd1e0e0f4774aaedfa0a6a1af9408f9ec755/> (ISSN) 0972-592X.
- Bradford, MM (1976). Metode cepat dan sensitif untuk mengukur kuantitas mikrogram protein dengan menggunakan prinsip pengikatan protein-pewarna. *Biokimia Analitik*. 72(1), 248–254. DOI: [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chakraborty, AJ, Mitra, S., Tallei, TE, Tareq, AM, Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, TB, Simal-Gandara, J. dan Capasso, R. (2021). Bromelain merupakan senyawa bioaktif yang potensial: Tinjauan komparatif dari perspektif farmakologis. *Life* (Basel, Swiss). 11(4), 317–342. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11040317>.
- Choi, WM, Lam, CL, Mo, WY dan Wong, MH (2016). Peningkatan limbah makanan dengan bromelain dan papain untuk meningkatkan pertumbuhan dan ketebalan ikan mas rumput (*Ctenopharyngodon idella*). *Ilmu Lingkungan dan Penelitian Polusi*. 23, 7186–7194. DOI: 10.1007/s11356-  
Telepon: 015-4863-2.

- Corzo, CA, Waliszewski, KN dan Welti-Chanes, J. (2012). Afinitas bromelain buah nanas terhadap berbagai substrat protein. *Kimia Pangan*. 133(3), 631–635. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.>  
Jurnal Manajemen dan Kewirausahaan.2011.05.119.
- Damo, R. dan Icka, P. (2013). Evaluasi Indeks Kualitas Air untuk Air Minum. *Jurnal Studi Lingkungan Polandia*. 22(4), 1045–1051. <http://www.pjoes.com/Evaluation-of-Water-Quality-Index-r-nfor-Drinking-Water,89061,0,2.> html/ (ISSN) 1230–1485.
- Dubois, M., Gilles, KA dan Hamiton, JK, Rebers, PA dan Smith, F. (2002). Metode kolorimetri Dubois untuk penentuan gula dan zat terkait. *Kimia Analitik*. 28(3), 350-356.DOI: 10.1021/ac60111a017.
- Fadhilah, Y., Shoobihah, A., Setiasih, S., Handayani, S. dan Hudiyono, S. (2018). Pengaruh ion Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> sistein, dan asam benzoat terhadap aktivitas bromelain murni dari ekstrak inti nanas (*Ananas comosus* L. Merr). *Prosiding Konferensi AIP*. 2049(1), 1–6. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5082434>.
- Fageer, ASM dan El-Tinay, AH (2004). Pengaruh genotipe, praperlakuan malt dan pemasakan terhadap daya cerna protein dan fraksi protein jagung secara in-vitro. *Kimia Pangan*. 84(4), 613–619. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00286-3).
- Francis, G., Makkar, HPS dan Klaus, B. (2001). Faktor antinutrisi yang terdapat dalam bahan pakan ikan alternatif yang berasal dari tumbuhan dan pengaruhnya terhadap ikan. *Akuakultur*. 199(3), 197–227. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9).
- Jintanawit, W., Kanto, U., Juttupornpong, S. dan Harinasut, P. (2004). Studi analisis aktivitas kimia dan bromelain dari sari buah nanas dan pemanfaatannya untuk pencernaan protein dalam bungkil kedelai. Dalam: Prosiding Konferensi Tahunan Universitas Kasetsart ke-42: Kedokteran Hewan, Kedokteran Hewan. Universitas Kasetsart, Bangkok, Thailand. 26–32. [https://kukrdb.lib.ku.ac.th/proceedings/kucon/search\\_detail/result/8807PAPER.pdf](https://kukrdb.lib.ku.ac.th/proceedings/kucon/search_detail/result/8807PAPER.pdf).29.03.2022.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P. dan Rawdkuen, S. (2012). Limbah nanas: sumber potensial untuk ekstraksi bromelain. *Pengolahan Makanan dan Bioproduk*. 90(3), 385–391. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>.
- Klahan, R., Bundit, Y., Wiboonsirikul, J., Pinsurang, D. dan Laohasathit, S. (2021a). Evaluasi daya cerna protein, kandungan saponin, dan penghambat tripsin dalam pakan udang putih pasifik (*Litopenaeus vanamei*) yang dicerna dengan ekstrak kasar bromelain dari limbah nanas. Dalam: Prosiding Konferensi Internasional Perikanan dan Akuakultur. 7(1), Sri Lanka. 72–81. DOI: <http://doi.org/10.17501/23861282.2021.7106>.
- Klahan, R., Maliyaem, P. dan Pungneat, R. (2020). Kinerja pertumbuhan, pemanfaatan pakan, dan kualitas air udang putih pasifik yang diberi pakan suplementasi bubuk bromelain. Dalam: Prosiding Konferensi Tahunan Universitas Naresuan ke-17: Ketahanan untuk Era yang Tidak Pernah Normal. Universitas Naresuan, Phisanulok, Thailand. 54–66. <http://conference.nu.ac.th/nrc17/KERTAS.Pdf>.14.04.2022.

- Klahan, R., Onsuwan, P. dan Limprushya, S. (2021b). Kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan udang kaki putih yang diberi pakan tambahan ekstrak kasar dari mahkota dan kulit nanas. Dalam: Prosiding Konferensi Nasional ke-11 Sri-Ayutthaya Rajabhat University Group. Muang, Chonburi. 585–592. <http://rdi.rru.ac.th/ncsag2021/PAPER.pdf>. 15.04.2022.
- Koia, JH, Moyle, RL dan Botella, JR (2012). Analisis mikroarray profil ekspresi gen pada buah nanas yang sedang matang. *BMC Plant Biology*. 12, 240–252. DOI: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/240>.
- Kumara, BAMS dan Hettige, KDT (2020). Tahap pematangan memengaruhi kualitas nanas segar dan kering (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Mautitius di Sri Lanka. *Produksi Pangan Berkelanjutan*. 8, 29–37. DOI: <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/SFP.8.29>.
- Larocca, M., Rossano, R., Santamaria, M. dan Riccio, P. (2010). Analisis proteinase buah nanas [*Ananas comosus* (L.) Merr.] dengan zimografi 2-D dan identifikasi langsung bintik-bintik zimografi utama dengan spektrometri massa. *Kimia Pangan*. 123(4), 1334–1342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.016>.
- Manzoor, Z., Nawaz, A., Mukhtar, H. dan Haq, I. (2016). Bromelain: metode ekstraksi, pemurnian, dan aplikasi terapeutik. *Arsip Biologi dan Teknologi Brasil*. 59, 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150010>.
- Mohan, R., Sivakumar, V., Rangasamy, T. dan Muralidharan, C. (2016). Optimalisasi ekstraksi enzim bromelain dari nanas (*Ananas comosus*) dan penerapannya dalam industri proses. *Jurnal Biokimia dan Bioteknologi Amerika*. 12(3), 188–195. DOI:10.3844/ajbbsp.2016.188.195.
- Mohapatra, A., Rao, VM dan Ranjan, M. (2013). Studi perbandingan peningkatan produksi dan karakterisasi bromelain dari kulit, daging buah, dan batang nanas (*Anannus commas*). *Jurnal Internasional Kemajuan dalam Penelitian & Teknologi*. 2(8), 249–279. Diperoleh dari <http://www.ijoart.org/docs/Comparative-study-of-the-increased-production-characterization-of-Bromelain-from-the-peel/> (ISSN) 2278–7763.
- Mulyono, N., Rosmeilia, E., Moi, JGP, Valentine, BO dan Suhartono, MT (2013). Kuantitas dan kualitas bromelain pada beberapa buah nanas Indonesia. *Jurnal Internasional Biologi Terapan dan Teknologi Farmasi*. 4(2), 235–240. Diperoleh dari <http://www.ijabpt>.
- Jurnal Manajemen dan Kewirausahaan (ISSN) 0976–4550.
- Nadzirah, KZ, Zainal, S., Noriham, A., Normah, I. dan Siti Roha, AM (2012). Sifat fisiko-kimia ekstrak mahkota nanas varietas N36 dan aktivitas bromelain dalam berbagai bentuk. *Prosedur APCBEE*. 4, 130–134. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.11.020.
- Pang, WC, Ramli, ANM dan Abdul Hamid, AA (2020). Analisis ekspresi gen bromelain buah dalam pematangan *Ananas comosus* kultivar MD2. *Material Science Forum*. 981, 209–214. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.981.209>.
- Perva-Uzunaliy, A., Škerget, M., Knez, Ž, Weinreich, B., Otto, F. dan Grüner, S. (2006). Ekstraksi bahan aktif dari teh hijau (*Camellia sinensis*): Efisiensi ekstraksi katekin utama dan kafein. *Kimia Pangan*. 96(4), 597–605. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.03.015.



- Poba, D., Ijirana, I. dan Sakung, J. (2019). Aktivitas enzim bromelain kasar berdasarkan tingkat kematangan nanas. *Jurnal Akademika Kimia*. 8(4), 236–241. Diperoleh dari <https://jurnal.fkip.untad.ac.id/index.php/jak/article/download/89/688/> (ISSN) 2302–6030.
- Prachom, N. (2022). Pakan, formulasi pakan akuatik, dan teknologi untuk meningkatkan efisiensi produksi hewan akuatik (pengurangan biaya pakan). [https://www4.fisheries.go.th/local/file\\_dokumen/202003122112011file PAPER.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/file_dokumen/202003122112011file%20PAPER.pdf). 15.04.2022.
- Prakongpan, T., Nitithamyong, A. dan Luangpituksa, P. (2002). Ekstraksi dan aplikasi serat makanan dan selulosa dari inti nanas. *Jurnal Ilmu Pangan*. 67(4), 1308–1313. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10279.x>.
- Otoritas Air Provinsi. (2022). Standar penyediaan air PWA, Otoritas Air Provinsi Otoritas. [https://en.pwa.co.th/download/pwastandard50-1 PAPER.pdf](https://en.pwa.co.th/download/pwastandard50-1%20PAPER.pdf). 29.04.2022.
- Raÿys, V., Kliuÿininkas, L., Jankÿnaitÿ, D. dan Albrektienÿ, R. (2010). Penerapan atau untuk evaluasi pencemaran air. *Linnaeus Eco-Tech*. 10, 1082–1089. DOI: <https://doi.org/10.15626/Eco-Tech.2010>.
- Ramli, ANM, Manas, NHA, Hamid, AAA, Hamid, HA dan Illias, RM (2018). Analisis struktur komparatif bromelain pada buah dan batang dari *Ananas comosus*. *Kimia Pangan*. 266, 183–191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.125>.
- Tim Inti R. (2021). R: Bahasa dan Lingkungan untuk Komputasi Statistik. Yayasan R untuk Komputasi, Wina, Austria. <https://www.R-project.org/PAPER.pdf>. 29.04.2022.
- Sirijariyawat, A. dan Nontaloon, K. (2020). Aktivitas proteolitik ekstrak kasar dari berbagai bagian nanas dan pepaya. *Jurnal Pertanian Khon Kaen*. 48(suppl.1), 1087–1092. Diperoleh dari [https://kukr2.lib.ku.ac.th/kukr\\_es/CSC\\_NRAI/search\\_detail/result/401852/](https://kukr2.lib.ku.ac.th/kukr_es/CSC_NRAI/search_detail/result/401852/) (ISSN) 0125-0485.
- Sookying, D., Davis, DA dan Soller Dias da Silva, F. (2013). Tinjauan tentang pengembangan dan penerapan pakan berbasis kedelai untuk udang putih Pasifik *Litopenaeus vannamei*. *Nutrisi Akuakultur*. 19(4), 441–448. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12050>.
- Ullah, H., Chaiwong, S. dan Saengrayap, R. (2018). Aplikasi analisis citra untuk klasifikasi kematangan nanas 'Phulae'. Dalam Buku Prosiding Konferensi Internasional Pangan dan Biosains Terapan 2018. Universitas Chiang Mai, Chiang Mai, Thailand. 60–66. <http://202.28.24.38/Home/Home.aspx> PAPER.pdf. 10.05.2022.
- Wang, HH dan Chai, SY (2022). Ekstraksi fitur baru untuk klasifikasi kematangan nanas. *Jurnal Telekomunikasi dan Teknologi Informasi*. 1, 14–22. DOI: <https://doi.org/10.26636/jtit.2022.156021>.
- Wattanakul, T., Nonthapot, S. dan Watchalaanun, T. (2020). Faktor-faktor yang menentukan daya saing ekspor nanas olahan Thailand. *Jurnal Internasional Studi dan Penelitian Manajerial*. Jurnal Manajemen dan Kewirausahaan, 2013.

- Wiboonsirikul, J., Khuwjitjaru, P., Kimura, Y., Morita, H., Tsuno, T. dan Adachi, S. (2007). Optimasi produksi ekstrak dengan kandungan fenolik tinggi dan aktivitas penangkal radikal dari dedak padi yang dihilangkan lemaknya dengan pengolahan air subkritis. *Japan Journal of Food Engineering*. 8(4), 311–315. DOI: <https://doi.org/10.11301/jsfe2000.8.311>.
- Yuangsoi, B., Klahan, R., Charoenwattanasak, S. dan Lin, S.-M. (2018). Efek suplementasi ekstrak limbah nanas dalam pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) terhadap pertumbuhan, pemanfaatan pakan, dan ekskresi nitrogen. *Jurnal Akuakultur Terapan*. 30(3), 227–237. DOI: <http://doi.org/10.1080/10454438.2018.1439794>.