

Isolasi Enzim Bromelin dari Buah Nanas dan Aplikasinya pada Pembuatan Kecap Berbahan Baku Keong Mas

Febrianto Adi Nugroho

Jurusan Teknik Kimia
Fakultas Teknik - Universitas Jenderal Achmad Yani
E-mail : adinugroho2@yahoo.com

Abstrak. Bromelin merupakan enzim proteolitik yang berasal dari buah nanas (*Ananas comosus* dan *Ananas bracteatus*). Sebagai enzim proteolitik, bromelin mampu memecah molekul-molekul protein menjadi bentuk asam amino. Pada penelitian ini enzim bromelin digunakan dalam pembuatan kecap dari keong mas sebagai katalis. Pembuatan kecap dari keong mas tersebut bertujuan untuk memanfaatkan kandungan protein yang terdapat pada keong mas. Diharapkan masyarakat khususnya petani akan mendapatkan manfaat dan nilai tambah dari pengolahan tersebut dengan mengusahakan kecap keong mas sebagai penghasil sampingan. Variabel yang dipelajari pada penelitian ini adalah perbandingan penggunaan komposisi antara bonggol nanas dengan keong mas pada perbandingan 1 : 1 (A), 1 : 2 (B), dan 1 : 3 (C) serta waktu proses hidrolisa enzimatis terhadap keong mas. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh hasil bahwa kecap yang paling disukai adalah kecap yang dibuat dengan perbandingan 1 : 2 dengan lama proses pembuatan 3 hari.

Kata kunci : Bromelin, kecap, keong mas

1 Pendahuluan

Bromelin merupakan enzim proteolitik yang berasal dari buah nanas (*Ananas comosus* dan *Ananas bracteatus*). Sebagai enzim proteolitik, bromelin mampu memecah molekul-molekul protein menjadi asam amino. Karena kemampuannya tersebut, enzim bromelin ini sering digunakan sebagai pelunak daging. Pada penelitian ini enzim bromelin digunakan pada proses produksi kecap berbahan baku keong mas. Diharapkan masyarakat khususnya petani akan mendapatkan manfaat dan nilai tambah dari pengolahan tersebut dengan mengusahakan pembuatan kecap keong mas sebagai penghasil sampingan.

2 Enzim Bromelin

Enzim bromelin dapat di ekstraksi dari batang nanas yang disebut *steam bromelin* atau dapat pula di ekstraksi dari buah yang disebut *bromelin bras (fruit bromelain)*. Penelitian tentang sifat-sifat enzim ini telah lama dilakukan dan telah diperoleh beberapa data yang menggambarkan sifat fisik dan kimianya. Bromelin batang dapat dipisahkan atas lima komponen proteolitik aktif yang berbeda dalam komposisi asam aminonya, dimana gugus amino ujung adalah *valine* sedangkan bagian ujung dari gugus karboksil adalah *glisine*.

Sifat-sifat fisik enzim bromelin antara lain ditemukan oleh YAMADA (1979) yang menyebutkan bahwa bromelin buah merupakan protein sederhana dengan titik isolistrik pada pH 4,6 dengan degradasi bertahap ditemukan bahwa asam amino ujung dari brome-

lin buah mempunyai susunan sebagai berikut : Alaval-Pro-Gln-Ser-Ile-Asp-Trp-Arg-Asp-Tyr-Gly-Ala. Sedangkan deretan asam amino disekitar bagian aktifnya yaitu : Asn-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys, dimana Cys adalah gugus *cystein* aktif. Sedangkan bromelin batang termasuk golongan glikoprotein yaitu mengandung satu bagian oligosakarida pada tiap molekul, yang berikatan secara kovalen dengan rantai polipeptida enzim tersebut.

Enzim bromelin batang ini mempunyai keaktifan terhadap gugus -SH dan gugus ini merupakan tempat aktivitas hidrolisa katalitiknya, adapun deretan asam amino disekitar bagian aktifnya dapat ditunjukkan sebagai berikut, Cys-Gly-Ala-Cys-Trp-Asn-Gly-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys-Trp-Cys menunjukkan bagian aktifnya.

Aktivitas enzim bromelin dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya kematangan buah, pH, konsentrasi dan waktu inkubasi. Dengan demikian enzim tersebut mempunyai kisaran pH dan suhu tertentu yang memengaruhi kemampuan katalisisnya sehingga menyebabkan aktivitas enzim menjadi maksimum jika konsentrasi substrat dan enzim konstan (Lehninger, 1993).

Aktivitas enzim bromelin dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya kematangan buah, pH, konsentrasi dan waktu inkubasi. Dengan demikian enzim tersebut mempunyai kisaran pH dan suhu tertentu yang memengaruhi kemampuan katalisisnya sehingga menyebabkan aktivitas enzim menjadi maksimum jika konsentrasi substrat dan enzim konstan (Lehninger, 1993). Apabila dilakukan variasi konsentrasi substrat maka dapat diketahui harga konstanta disosiasi enzim dengan substrat atau dikenal dengan KM. Selain itu juga dapat diketahui harga kecepatan maksimum pada konsentrasi substrat tertentu di mana gejala tersebut disebut dengan kinetika penjumlahan. Apabila enzim bekerja pada kondisi optimum tersebut, diharapkan diperoleh produk yang maksimal.

Kematangan buah : Hasil penelitian TOKKONG (1979) menunjukkan bahwa semakin matang buah maka enzim bromelin dalam buah tersebut semakin kurang aktif. Hal ini disebabkan pada waktu pematangan buah terjadi pembentukan senyawa tertentu, dalam hal ini enzim sebagai protein mungkin ikut terpakai dalam senyawa tersebut sehingga sebagian struktur enzim akan rusak, akibatnya keaktifannya pun berkurang. Disamping itu, buah yang masak menunjukkan pH 3,0-3,5, dan pada suasana asam sebagian enzim bromelin terdenaturasi atau mengalami perubahan konformasi struktur, sehingga keaktifannya berkurang.

Pengaruh pH : Aktivitas enzim bromelin optimum pada pH 6,5 dimana enzim mempunyai konformasi yang mantap dan juga mempunyai aktivitas yang maksimum. Apabila pH yang digunakan terlalu tinggi atau terlalu rendah akan terjadi beberapa perubahan yaitu denaturasi protein dengan kecepatan katalisa menurun. Pada pH rendah, enzim yang bermuatan negatif (E⁻) akan terprotonasi dan muatan negatif hilang. Reaksi yang terjadi adalah:



Sedangkan pada pH tinggi, SH⁺ pada enzim bromelin akan terionisasi dan muatan positifnya hilang.



Dengan demikian terlihat konsentrasi efektif E^+ dan SH^+ lebih rendah, maka kecepatan katalis enzim menurun.

Pengaruh suhu : Suhu optimum untuk enzim bromelin adalah $500^{\circ}C$, di atas dan dibawah optimal, energi kinetik molekul substrat maupun enzim cukup rendah sehingga kemungkinan substrat dan enzim untuk bertemu dan bereaksi kecil dan kecepatan reaksi menjadi rendah. Ditambahkan oleh HARROW dan MAZUR (1971), bahwa suhu optimum suatu enzim sangat dipengaruhi oleh kemurnian enzim tersebut.

Pengaruh konsentrasi dan waktu : Kecepatan katalis enzim meningkat pada konsentrasi yang lebih besar dan waktu yang lebih lama. Hal ini disebabkan adanya konsentrasi substrat untuk tiap mol enzim. Dengan bertambahnya mol enzim maka dengan konsentrasi substrat yang tentu akan menyebabkan kecepatan katalis semakin besar, walaupun hubungan ini bersifat linier. Waktu yang lebih lama akan menyebabkan daya kerja enzim untuk mengkatalis menjadi lebih lama dan tentunya akan menyebabkan hasil yang lebih banyak pula, bergantung dengan konsentrasi substrat yang ada.

3 Kecap

Terdapat tiga cara dalam pembuatan kecap yaitu fermentasi, hidrolisa kimia dan hidrolisa enzimatis, tetapi dapat juga dengan cara kombinasi. Pada pembuatan kecap keong mas ini dipakai cara hidrolisis enzimatis yaitu menggunakan enzim bromelin dari tongkol nanas yang telah diaktifkan. Pembuatan kecap keong mas hampir sama dengan kecap ikan dan biasanya rasa yang dihasilkan asin sehingga perlu penambahan gula untuk mengimbangi rasa asin tersebut.

Pembuatan kecap dengan fermentasi dan hidrolisa enzimatis tidak terlalu beda. Proses fermentasi menggunakan mikroba sebagai penghasil katalis sedangkan hidrolisa enzimatis menggunakan enzim bromelin sebagai katalis. Tetapi ada perbedaan yang sangat mencolok yaitu pada waktu proses dimana cara fermentasi memerlukan waktu 4 – 7 bulan sedangkan cara hidrolisa enzimatis hanya 3 – 5 hari sehingga waktu menjadi lebih efektif. Tetapi kekurangan kecap yang dibuat secara enzimatis aroma yang dihasilkan tidak sekuat kecap yang difermentasi tradisional. Kelemahan lainnya adalah terbentuknya senyawa-senyawa peptida tertentu yang berasa pahit dan bau yang kurang enak. Aroma yang kurang enak tersebut dapat dikurangi dengan menghentikan proses tersebut tepat sebelum terbentuknya senyawa peptida.

Pada pembuatan kecap dari keong sawah dengan cara hidrolisa enzimatis, cepatnya proses pembuatan kecap diakibatkan oleh penambahan nenas sebagai sumber enzim bromelin yang berfungsi menguraikan dan melarutkan protein yang terdapat pada daging keong mas. Selama proses hidrolisis berlangsung terbentuk asam glutamat dan asam butirat, selanjutnya keduanya diidentifikasi sebagai senyawa yang berpengaruh terhadap aroma yang baik pada kecap.

Kecap dari keong mas memiliki protein yang lebih tinggi daripada kecap dari bahan kedelai. Kecap dari keong mas mempunyai protein sebesar 5 persen dari berat basah, se-

dangkan kecap kacang kedelai hanya 2-3 persen dari berat basah. Persyaratan yang ditentukan oleh pemerintah untuk pembuatan kecap masih beragam menurut standar mutu barang No. 25/DSNPM/78, kecap perasa sedang yang diperdagangkan harus mengandung kadar protein kasar 3%, kadar garam 10%, kadar gula 10-20%, memiliki bau dan warna khas kecap, tidak mengandung logam berbahaya dan tidak berjamur.

Sedangkan persyaratan lain menurut standar industri No. 32/S.I./74 adalah :

- - Kadar protein : mutu I minimum 6%, mutu II minimum 2%
- - Logam-logam berbahaya (Hg,Pb,Cu,As): negatif
- - Keadaan (bau, rasa, dll) : normal

Kecap yang bemutu baik adalah kecap yang memenuhi syarat untuk kecap manis dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 Syarat untuk kecap manis*

	Kandungan
BJ	Minimum 1,35
pH	4,62
Bau, rasa, dan warna	Normal/biasa
Garam (NaCl)	Maksimum 10%
Gula (jumlah sakarosa)	Minimum 35%
Reaksi terhadap lakmus	Tidak boleh alkalis
Zat pemanis dan warna buatan	Negatif
Bahan-bahan berbahaya	Negatif
Jamur	Negatif

*) Sumber : BALAI PENELITIAN KIMIA BANDUNG (1978)

4 Metode Penelitian

4.1 Bahan-bahan Kimia

Bahan-bahan kima yang digunakan adalah : pereaksi biuret, buffer phospate 0,1 M pH 6,7,8, Amonium Sulfat, kasein 2%, TCA 20%, *buffer asetat* pH 5, pereaksi follin, L-sistein 0,1 M, NaOH 0,5 M, *Etanol absolute*, HCl.

Penetapan Variabel

Variabel yang diubah nilainya :

1. Penggunaan sumber enzim bromelin dari bonggol nanas (B1) yang terlebih dahulu dilakukan proses isolasi enzimatik (pengaktifan enzim).
2. Proses fraksinasi dengan amonium sulfat 0 – 20%, 20 – 40%, 40 – 60%
3. Perbandingan penggunaan komposisi antara bonggol dengan keong mas pada perbandingan 1 : 1 (A), 1 : 2 (B), dan 1 : 3 (C).
4. Waktu proses hidrolisa enzimatik terhadap keong mas : A1 (3 hari), A2 (4 hari), A3 (5 hari), B1 (3 hari), B2 (4 hari), B3 (5 hari), C1 (3 hari), C2 (4 hari), C3 (5 hari)

Kecap yang bemutu baik adalah kecap yang memenuhi syarat untuk kecap manis dapat dilihat pada tabel 1.

4.2 Pembuatan Enzim Bromelin

a. Isolasi Enzim Bromelin

Batang atau bonggol nanas dihaluskan dengan *homogenizer* dan diambil filtratnya kemudian ditambahkan *buffer fosfat* 0,1 M pH 7. Untuk memisahkan bagian-bagian yang tidak larut yang masih ada di dalam filtrat dilakukan pemisahan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit pada suhu 25°C, sehingga diperoleh filtrat yang mengandung ekstrak kasar enzim bromelin.

b. Fraksinasi Enzim Bromelin

Proses fraksinasi ini menggunakan *amonium sulfat* dengan kadar sedemikian hingga tercapai kejenuhan 20%, 40%, 60%, 80%. Setiap fraksi enzim yang diendapkan dilarutkan kedalam larutan *buffer fosfat* 0,1 M pH 7 dan selanjutnya didialisis.

c. Karakterisasi Enzim Bromelin

Proses ini dilakukan dengan melihat fraksi enzim bromelin dengan aktivitas tertinggi yang ditentukan oleh konsentrasi substrat, suhu optimum, dan pH optimum. Kondisi optimum tersebut ditentukan berdasarkan aktivitas maksimum yang dicapai. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan variasi suhu pada 45,50,55,60,65,70 °C. Sedangkan penentuan pH optimum dilakukan pada variasi pH 4,5,6,7,8, dan 9.

d. Penentuan K_M dan v_{maks}

Proses penentuan nilai K_M dan v_{maks} dilakukan berdasarkan variasi konsentrasi substrat dan diperoleh aktivitas enzim yang sebanding dengan kecepatan reaksi enzimatik. Pada berbagai konsentrasi substrat *kasein* yaitu 2,4,6,8,10, dan 12 mg/ml selanjutnya harga K_M dan v_{maks} ditentukan dari grafik antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi ditransformasikan dari persamaan *Michaelis-Menten* yaitu :

$$v = v_{maks} \cdot [S] / K_M + [S]$$

ke dalam persamaan *Lineweaver-Burk* yaitu :

$$1/v_0 = K_M / v_{maks} \cdot 1/[S] + 1/v_{maks}$$

Nilai K_M dan v_{maks} akan didapat dengan membuat grafik antara $1/v$ dengan $1/[S]$.

e. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein dilakukan dengan metode *Biuret* pada λ 520 nm sebagai standar digunakan larutan *kasein* dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 2,4,6,8,10, dan 12 (mg/ml).

f. Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diuji menggunakan metode *Bergmeyer* yang didasarkan kepada kemampuan protase menghidrolisa substrat menjadi tirosin yang dilakukan oleh enzim bromelin. Filtrat yang diperoleh dibaca pada spektrofotometer terhadap blanko masing-masing pada 280 nm. Dalam menentukan nilai aktivitas enzim dibuat kurva standar tirosin dengan konsentrasi sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi tirosin dapat diketahui jumlah tirosin yang dibebaskan.

kan oleh enzim. Unit aktivitas protase dinyatakan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan kenaikan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm yang setara dengan sejumlah Ug tirosin / ml enzim / menit.

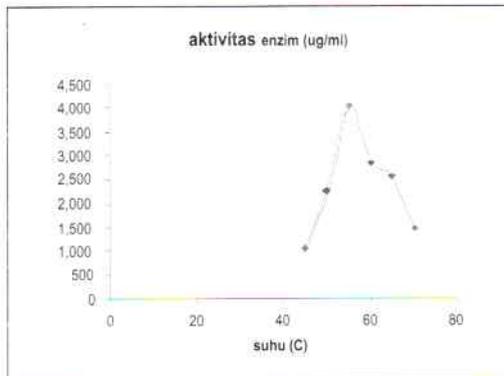
$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Ug tirosin/menit}}{\text{mol Enzim}}$$

4 Pembuatan Kecap

1. Membersihkan dan mengambil keong mas dari cangkangnya.
2. Merebus keong mas pada suhu 70°C selama 1 jam, setelah itu diamkan sampai suhunya 50°C.
3. Mencampur daging keong mas masing-masing sebanyak 60 gram dengan bonggol atau daging buah nanas dengan perbandingan 1 : 1 (A), 1 : 2 (B) dan 1 : 3 (C) kemudian menghaluskannya.
4. Menambahkan garam sebanyak 20 % dari berat keong mas pada pencampuran tersebut yang bertujuan untuk mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk, kemudian menyimpannya dengan cara diinkubasi pada suhu 50°C selama 3 hari.
5. Menambahkan air dengan perbandingan 1:4 pada campuran yang telah dihan-curkan, kemudian panaskan pada suhu 70 - 80°C selama 15 menit kemudian menyaringnya.
6. Memanaskan filtrat hasil penyaringan tersebut pada suhu 70 – 80°C, setelah 15 menit tambahkan bumbu-bumbu yang telah disiapkan
8. Memasak campuran tersebut selama 2 jam kemudian dilakukan penyaringan untuk membuang ampas dan cairan hasil penyaringan yang merupakan produk kecap keong mas.
9. Menganalisa produk kecap keong mas (rasa, aroma, kekentalan, warna, kadar protein).

5 Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan kandungan protein yang terdapat pada keong mas sebagai bahan baku pembuatan kecap dengan menggunakan enzim bromelin. Selain itu penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan mempelajari karakterisasi enzim bromelin dari batang nanas. Enzim bromelin dapat diperoleh dari tanaman nanas baik tangkai, kulit, buah, daun dan batangnya (bonggol) dan selama ini beberapa penelitian banyak menggunakan buahnya untuk memperoleh enzim bromelin. Pada penelitian ini enzim bromelin diisolasi dari bonggolnya yang selama ini belum banyak dimanfaatkan. Menurut Hartadi enzim bromelin paling banyak terdapat pada bonggol buah nanas. Ekstrak kasar enzim bromelin yang diperoleh difraksinasi dengan Amonium Sulfat, dengan variasi persen (%) amonium sulfat. Fraksi antara 40 – 60% menunjukkan aktivitas bromelin dan kadar protein tertinggi, yaitu kadar protein = 2,826 mg/ml dan aktivitasnya adalah = 1,998 ug/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pada variasi ini terdapat ekstrak protein paling banyak dan sebagian besar dari protein tersebut merupakan enzim bromelin yang ditunjukkan dengan nilai aktivitas tertinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya.



Gambar 1 Hubungan antara aktivitas enzim terhadap suhu

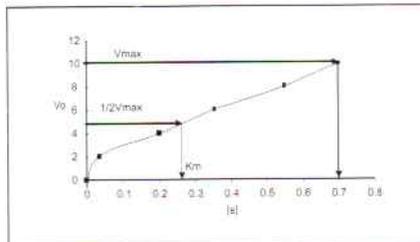
Penggunaan enzim bromelin pada pembuatan kecap keong mas dengan berbagai perlakuan yang berbeda menghasilkan kadar protein yang tertinggi pada perlakuan B1 (2 : 1) dengan lama hidrolisa 3 hari yaitu 4,6 mg/ml (tabel 2.). Bila dirata-ratakan antara B1, B2, dan B3 kadar protein yang didapat adalah 3,733 mg/ml. Hal ini disebabkan oleh perbandingan antara daging keong dengan enzim, karena protein yang dihidrolisa relatif lebih banyak.

Tabel 2 Kadar protein kecap keong mas

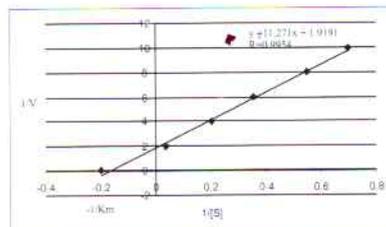
Perlakuan (kode)	pH	Kadar protein (mg/ml)	Kadar protein (rata-rata)
A1	5,65	3	
A2	5,60	2,5	2,967
A3	5,70	3,4	
B1	5,72	4,6	
B2	5,60	3,4	3,733
B3	5,66	3,2	
C1	5,59	2,6	
C2	5,67	2,4	2,667
C3	5,66	3	

Penentuan K_M dan v_{maks} dilakukan berdasarkan variasi konsentrasi substrat dan diperoleh aktivitas enzim yang sebanding dengan kecepatan reaksi enzim. Berdasarkan persamaan garis pada Gambar 2. diperoleh harga $K_M = 5$ mg/ml. Nilai K_M tersebut menyatakan tetapan disosiasi kompleks enzim-substrat. Apabila nilai K_M kecil menunjukkan kompleks

enzim tersebut semakin mantap sehingga mempunyai *afinitas* yang tinggi terhadap substrat dan sebaliknya. Harga v_{maks} diperoleh 0,5 mg/ml menit, hal ini menunjukkan bahwa setiap mililiter ekstrak kasar bromelin menghasilkan produk setiap menitnya maksimal 0,5 mg.



Gambar 2 Kurva Michaelis-Menten



Gambar 2 Kurva Lineweaver-Burkichaelis

Tabel 3 Uji organoleptik

Perlakuan (kode)	organoleptik				Hasil Rata-rata
	Rasa	Aroma	Warna	Kekentalan	
A1	4,7	4,5	4,4	4,4	4,500
A2	4,5	4,4	4,3	4,6	4,450
A3	4,8	4,6	4,2	4,7	4,575
B1	4,4	4,2	4,3	4,8	4,425
B2	4,3	4,7	4,4	4,9	4,575
B3	4,5	4,5	4,6	4,6	4,550
C1	4,5	4,5	4,2	4,7	4,475
C2	4,6	4,4	4,5	4,6	4,525
C3	4,7	4,6	4,3	4,7	4,575

Keterangan :

1. Paling senang. 4. Cukup senang 7. Cukup tidak senang

- | | | |
|-------------------|-----------------|------------------------|
| 2. Senang sekali. | 5. Biasa | 8. Tidak senang |
| 3. Senang sedikit | 6. Tidak senang | 9. Sangat tidak senang |

Hasil pengujian pH pada kecap keong mas ini paling tinggi pada kode B1 yaitu 5,72 sedangkan pH paling rendah kode C1 yaitu 5,59. Sedangkan pH kecap menurut BALAI PENELITIAN KIMIA BANDUNG (1978) adalah 4,62. Hal ini disebabkan oleh beberapa bumbu-bumbu yang memiliki sifat tidak asam, sehingga sangat mempengaruhi pH kecap keong mas.

6 Kesimpulan

1. Proses isolasi enzim bromelin untuk memperoleh fraksinasi ekstrak kasar dengan amonium sulfat pada fraksi 40 - 60% menghasilkan aktivitas bromelin dan kadar protein paling tinggi, yaitu aktivitas bromelin 1,998 ug/ml dengan kadar protein 2,826 mg/ml.
2. Suhu optimum dicapai pada 55oC dengan nilai aktivitas 4,050 ug/ml.
3. Harga KM yang didapat yaitu 5 mg/ml, sedangkan harga Vmax adalah 0,5 mg/ml menit.
4. Pada uji organoleptik kecap yang paling banyak disukai adalah B1 dengan nilai 4,425. Sedangkan yang kurang disenangi adalah kecap dengan kode A3, B2, dan C3 dengan nilai 4,475.
5. Pada pengujian kadar protein dan pH pada kecap keong mas, kadar protein yang tertinggi terdapat pada kode B1 yaitu 4,6 dan kadar protein rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan B. Sedangkan nilai pH tertinggi terdapat pada kode B1 yaitu 5,7 dan terendah terdapat pada kode C1 yaitu 5,59.

Daftar Pustaka

1. Lehninger, Albert L., 1970, *Biocemistry : The Molecular Basic of Cell Structure and Function*, 1st ed., Worth Publisher, Inc., New York, N. Y. 10011.
2. Mahler H.R. & E.H. Cordes, 1966, *Biological Chemistry*, Harper and Row Publishers, New York.
3. Wirahadikusumah, Muhamad., 1989, *Biokimia : Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. ITB., Bandung.
4. Purnomo, Agus H., 1985., *Penelitian Pembuatan Kecap Ikan Secara Hidrolisa Enzimatis.*, Pusat Penelitian dan Pengembangan., Jakarta.
5. Darwis, A Azis dan Sakara E., 1990. *Isolasi, Pemurnian dan karakteristik Enzim*. IPB., Bogor.
6. Lehninger, Albert L. 1993. *Dasar-dasar Biokimia, Alih Bahasa Meggy Thenawijaya*. Penerbit Erlangga, Jakarta.
7. Indrawati, T., 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah dengan Menggunakan Enzim Bromelin.*, PN. Balai Pustaka, Jakarta.
8. Poesponegoro. Milono.1977. *Pengaruh Faktor-faktor Tertentu Dalam Proses Pembuatan Kecap Secara Fermentasi*. Lembaga Kimia Nasional. Jakarta.
9. Sastrodiwiryo., 1971. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*, PAU Pangan dan Gizi, UGM. Yogyakarta.

10. Soekarto, T.S., 1985. *Penilaian Organoliptik Untuk Industri Pangan dan Hasil Pertanian*, Bharata. Jakarta.
11. Hartimah, Sri dan Wardana Ismail., 1989. *Penelitian Pendahuluan Budidaya Keong Mas*. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Bogor.
12. Departemen Perindustrian., 1974. *Mutu dan Cara Uji Kecap, Standar Industri Indonesia*. Departemen Perindustrian. Jakarta.