

EFEKTIVITAS BROMELIN SEBAGAI DEPROTEINASI KUTIKULA PINJAL PADA PROSES PREPARAT PERMANEN

*Effectiveness of Bromelin as Deproteination of The Flea Cuticle in The
Permanent Preparation Process*

Dewi Nurhayati¹, Yuliansyah Sundara Mulia¹, Amadda Fadhila Azhiima²

¹ Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Bandung

² Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung

*Email: dewinurhayati66.dn@gmail.com

ABSTRACT

Chitin is one of the constituent components of the arthropod exoskeleton. Peptide bonds in chitin can be broken using KOH solution as deproteinization. The deproteinization process will cause the chitin layer of the exoskeleton to thin. The Bromelain enzyme from pineapple is able to break down peptide bonds. Bromelain will be used in the deproteinase process of the flea chitin exoskeleton. The aim of the research was to determine the ability of bromelain to deproteinize the flea exoskeleton. Quasi-experimental research method, 96 cat fleas. Three treatment groups of 15%, 20% and 25% concentration of bromelain and one control group of 10% KOH solution will be contacted with the fleas, with a soaking time of 24 hours and 48 hours, and carried out three repetition times. The thinning process will end with the application of entelan as an adhesive for the preparation. This research was conducted from April to October 2020, at the Integrated Laboratory and Parasitology Laboratory of the Health Analyst Department, Bandung Health Polytechnic. The results of microscopic examination of the preparations were then analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test. The results obtained were <0.05 indicating that there was a difference which was significant for all treatments. The results of data analysis produced the highest quality of deproteinization in the 25% Bromelain treatment and for the optimal time which produced the highest quality of deproteinization at 48 hours.

Keywords: *Bromelain, Deproteinization, Fleas*

ABSTRAK

Kitin yang merupakan salah satu komponen penyusun eksoskeleton arthropoda. Kitin merupakan polimer rantai panjang N-asetilglukosamin, turunan Amida dari glukosa. Ikatan peptide pada kitin dapat dipecah menggunakan larutan KOH yang berfungsi sebagai deproteinasi. Proses deproteinasi akan menyebabkan lapisan kitin eksoskeleton menipis. Enzim dari buah nenas (*Ananas comosus L. Merr*) var. Subang yaitu Bromelin terbukti memiliki kemampuan untuk memecah ikatan peptida. Bromelin merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan baik untuk industri pangan maupun non pangan. Bromelin akan digunakan pada proses deproteinase eksoskeleton pinjal yang mengandung kitin. Tujuan Penelitian adalah untuk menentukan kemampuan bromelin sebagai deproteinasi kutikula pinjal. Metode penelitian quasi eksperimen, pinjal kucing sebanyak 96 ekor terbagi menjadi tiga kelompok perlakuan kontak bromelin dan serangga dalam konsentrasi 15%, 20% dan 25% dibandingkan dengan satu kelompok kontrol kontak larutan KOH 10 % dan serangga, dengan waktu perendaman selama 24 jam dan 48 jam, serta dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil penelitian yang sudah dilakukan dari tahapan penipisan dengan bromelin 15%, 20% dan 25% selama 24 jam dan 48 jam. Proses penipisan akan berakhir dengan pemberian entelan sebagai perekat

preparat. Penelitian ini berlangsung selama 7 bulan dari bulan April sampai dengan Oktober 2020. Lokasi penelitian adalah Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Parasitologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Bandung Hasil pemeriksaan secara mikroskopis dari preparat kemudian di analisis dengan uji Kruskal-Wallis dan Mann Whitney diperoleh hasil <0.05 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan untuk semua perlakuan Hasil analisis data menghasilkan kualitas tertinggi deproteinasi pada perlakuan Bromelin 25% dan untuk waktu optimal yang menghasilkan kualitas deproteinasi tertinggi pada waktu 48 jam.

Kata kunci: Bromelin, Deproteinasi, Pinjal

PENDAHULUAN

Enzim adalah biokatalisator yang merupakan pusat dari setiap proses biokimia. Bertindak dalam urutan terorganisir, mereka mengkatalisasi ratusan reaksi bertahap yang mendegradasi molekul nutrisi, melestarikan dan mengubah energi kimia, dan membuat makromolekul biologis dari prekursor sederhana.¹

Enzim protease merupakan jenis enzim yang berfungsi sebagai katalis untuk menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang menghasilkan peptida atau asam amino.²

Buah nanas mengandung komponen bromelin yang merupakan enzim protease sulfhidril (-SH) yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi ikatan senyawa asam amino yang lebih sederhana. Enzim ini juga digunakan untuk aplikasi industri pada pelarutan protein gandum, penstabilan bir, produksi hidrolisat protein, dan penyamakan kulit.³

Hasil penelitian tentang Ekstrak bonggol nanas memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM): 1,25% dan Diameter Daerah Hambat (DDH) sebesar $17,3125 \pm 4,11$ mm.^{4,5} Hasil penelitian lainnya tentang efektivitas bromelin dari hasil isolasi buah nanas dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada konsentrasi 2,5% sebesar 32,7 mm yang dikategorikan sebagai daya hambat⁵ dengan sensitivitas yang tinggi. Dalam penelitian ini bromelin mampu mendenaturasi protein yang terdapat

pada lipoprotein dinding sel *Candida albicans*.⁶

Pinjal merupakan salah satu jenis serangga yang hidup pada hewan domestik pada kerangka tubuhnya mengandung senyawa kitin, polimer rantai panjang N-asetilglukosamin, turunan Amida dari glukosa. Pembuatan preparat serangga pada umumnya menggunakan KOH yang larutan basa kuat dan dapat digunakan sebagai larutan penipisan kutikula. Tebal tipisnya sediaan memengaruhi kualitas sediaan agar pada saat diamati pada mikroskop terlihat bagian tubuh atau morfologi pinjal. Indikator sediaan yang baik apabila morfologi terlihat jelas tanpa ada sisa-sisa kitin, sedangkan sediaan yang buruk jika morfologi pinjal masih belum terlihat jelas karena masih ada lapisan kitin. Larutan basa kuat dapat digunakan untuk deproteinasi kitin. Kitin pada serangga yang berikatan dengan protein akan dipecah ikatan peptida, pecahnya ikatan peptida akan menyebabkan lapisan kitin eksoskeleton menipis.^{7,8,9} Bromelin diduga memiliki kemampuan yang sama untuk menipiskan kutikula serangga, sehingga dapat digunakan dalam proses pembuatan preparat.

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk menentukan kemampuan bromelin sebagai deproteinasi kutikula pinjal. Penelitian ini menjadi penting dalam penggunaan bahan alami seperti bromelin yang dapat menjadi bahan alternatif pengganti dari larutan KOH 10% pada proses pembuatan preparat permanen.

METODE

Rancangan penelitian adalah quasi eksperimen yaitu pinjal direndam dalam bromelin untuk memperoleh kualitas preparat permanen dibandingkan dengan perendaman menggunakan KOH 10%.

Penelitian ini berlangsung selama 7 bulan dari bulan April sampai dengan Oktober 2020. Lokasi penelitian adalah Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Parasitologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Bandung .

Unit eksperimen Penelitian ini adalah pinjal kucing yang diperoleh dari Laboratorium Entomologi, Jurusan TLM Poltekkes Bandung. Pinjal sebanyak 96 ekor terbagi menjadi tiga kelompok perlakuan kontak bromelin dan serangga dalam konsentrasi 15%, 20% dan 25% dibandingkan dengan satu kelompok kontrol kontak larutan KOH 10 % dan serangga, dengan waktu perendaman selama 24 jam dan 48 jam, serta dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil penelitian yang sudah dilakukan dari tahapan penipisan dengan bromelin 15%, 20% dan 25% selama 24 jam dan 48 jam. Proses penipisan akan berakhir dengan pemberian entelan sebagai perekat preparat

Isolasi Bromelin dari Buah Nanas

Buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) var. Subang. Karakteristik buah nanas yaitu buah masih mengkal, ditandai dengan warna kulitnya hijau kekuningan, untuk memastikan dilakukan determinasi sebelumnya di laboratorium Biologi ITB Bandung. Buah nanas dicuci dengan aquades, dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 1.500 gram, selanjutnya di jus dan disaring sehingga diperoleh cairan jernih (ekstrak kasar bromelin). Ditambahkan buffer pH 7. Disimpan pada suhu 4°C selama 3 jam. Kemudian ke dalam filtrat ekstrak kasar bromelin ditambahkan amonium sulfat konsentrasi 40% sambil diaduk menggunakan pengaduk magnet selama 45 menit, kemudian diinkubasi

semalam pada 4°C. Selanjutnya, disaring menggunakan kertas whatman no. 1. Endapan yang diperoleh dikeringkan dengan cara freeze dried.¹⁰

Pembuatan preparat serangga

Pinjal dimatikan terlebih dengan alkohol 70 %. Pinjal mati kemudian dimasukkan ke dalam KOH 10% selama 24-48 jam pada suhu kamar. Dilakukan Proses dehidratasi bertingkat dengan alkohol 70%, 80% dan 95%, tiap fase dilakukan selama 10 menit.

Dilakukan proses clearing pencucian dengan larutan xylol. Ektoparasit itu telah siap untuk diawetkan dalam preparat kaca, kemudian dilakukan proses mounting dengan ditetaskan entelan di atas preparat kaca kemudian ditutup dengan cover glass dan selanjutnya disimpan selama 2-3 hari.¹⁰⁻¹²

Data hasil penelitian dari kualitas preparat akan diolah dengan Uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.

HASIL

Gambaran morfologi Pinjal



Gambar 1. Pinjal tanpa perlakuan

Morfologi pinjal tanpa perlakuan masih utuh, kutikula tidak jernih. (Gambar1)



Gambar 2. Pinjal dengan KOH 10%

Morfologi pinjal dengan perlakuan KOH 10%. Kutikula jernih dan tidak ada sisa darah. (Gambar 2)



Gambar 3. Pinjal + Bromelin 15%/24 jam

Penipisan kutikula pinjal dengan bromelin 15 selama 24 jam, kutikula pinjal yang belum terlihat jernih, masih terdapat sisa darah dan masih kaku (Gambar 3)



Gambar 4. Pinjal + Bromelin 15% /48 jam

Penipisan kutikula Pinjal dengan bromelin 15 % yang di deproteinasi selama 48 jam. Kutikula sudah mulai jernih dan sisa darah masih ada (Gambar 4).



Gambar 5. Pinjal + Bromelin 20%/ 24 jam

Penipisan kutikula Pinjal dengan bromelin 20% yang di deproteinasi selama 24 jam, kutikula belum terlihat jernih dan sisa darah berkurang (Gambar 5).



Gambar 6. Pinjal + Bromelin 20%/ 48 jam

Penipisan kutikula Pinjal dengan bromelin 20% selama 48 jam, kutikula pinjal sudah terlihat jernih, sisa darah berkurang (Gambar 6).



Gambar 7. Pinjal + Bromelin 25% - 24 jam

Penipisan kutikula Pinjal dengan bromelin 25% yang di deproteinasi selama 24 jam kutikula pinjal sudah terlihat jernih, dan sisa darah berkurang (Gambar 7)



Gambar 8. Pinjal + Bromelin 25% - 48 jam

Penipisan kutikula Pinjal dengan bromelin 25% yang di deproteinasi selama 48 jam, kutikula pinjal terlihat jernih, dan sisa darah sudah tidak terlihat (Gambar 8) .

Data penilaian 3 panelis diperoleh hasil rata-rata kualitas dari tiap konsentrasi seperti yang terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rata-Rata Kualitas preparat berbagai Konsentrasi

Perlakuan	Waktu (jam)	Kualitas kualitas preparat/ulangan*					
		1	2	3	4	5	6
Kontrol/ KOH 10%	24**	3	2	2	2	2	2
	48***	3	3	3	3	3	3
Bromelin 15 %	24	1	1	1	1	1	1
	48	1	2	1	1	2	2
	20 %	24	2	1	1	1	1
	48	2	2	1	2	2	2
	25 %	24	1	2	2	1	1
	48	2	2	2	2	2	2

Keterangan :*) Penilaian kualitas kutikula : 3 = Baik = Transparan; 2= Cukup baik = cukup transparan ; 1 = kurang baik = kurang transparan.

** 24 jam = A ; ***) 48 jam= B.

Pengolahan statistik yang pertama dilakukan adalah uji normalitas dari data kualitas kutikula hasil deproteinasi dengan KOH 40%, bromelin 15%, 20% dan 25%. Diperoleh hasil uji normalitas tiap konsentrasi perlakuan terhadap kualitas hasil deproteinasi dengan nilai sig < 0,05 maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal. Pengolahan statistik dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis (Tabel 2)

Tabel 2. Kualitas Deproteinasi

Konsentrasi	n	Mean Rank	p-value
KOH 10% A	6	33,33	0,000
KOH 10% B	6	45,00	
Bromelin 15% A	6	10,50	
Bromelin 15% B	6	20,75	
Bromelin 20% A	6	10,50	
Bromelin 20% B	6	27,58	
Bromelin 25% A	6	17,33	
Bromelin 25% B	6	31,00	
Total	48		

Uji Kruskal-Wallis

Tabel 2 menunjukkan hasil uji statistik dengan nilai sig <0.05 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan untuk semua perlakuan. Untuk melihat perbedaan waktu terhadap kualitas deproteinasi dari tiap perlakuan dilakukan uji Mann-Whitney

Tabel 3. Uji Mann- Whitney

Perlakuan	p-value
KOH 10% A dengan KOH 10% B	0,015
Bromelin 15% A dengan Bromelin 15% B	0,180
Bromelin 20% A dengan Bromelin 20% B	0,015
Bromelin 25% A dengan Bromelin 25% B	0,065

Tabel 3 menunjukkan pada perlakuan KOH 10% A dan B, diperoleh nilai sig < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan KOH 10%A dengan KOH 10% B. Pada perlakuan Bromelin 15% A dan B, diperoleh nilai sig > 0,05 yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan Bromelin 15% A dengan Bromelin 15% B. Pada perlakuan Bromelin 20% A dan B, diperoleh nilai sig < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan Bromelin 20% A dengan Bromelin 20% B. Pada perlakuan Bromelin 25% A dan B, diperoleh nilai sig > 0,05 yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan Bromelin 25% A dengan Bromelin 25% B

PEMBAHASAN

Pemeriksaan mikroskopis dari preparat yang diperoleh menunjukkan belum terdapat penipisan kutikula pinjal pada 24 jam setelah kontak bromelin. Kemungkinan proses deproteinasi masih pada bagian epikutikula, baru proses deproteinasi terhadap protein pada lipoprotein di lapisan semen, lapisan kutikulin, dan protein pada lapisan polifenol, sehingga masih terlihat kaku, sementara proses penipisan belum sampai terjadi pada bagian prokutikula dimana terkandung terutama sclerotin yang membentuk kutikula menjadi keras,

Penipisan kutikula pinjal pada 48 jam setelah kontak bromelin sudah mulai tampak jelas. Kemungkinan karena bagian prokutikula dimana terkandung terutama sklerotin yang

mampu di hidrolisis oleh bromelin menjadikan kutikula Pinjal ini tampak tidak terlalu kaku. Proses hidrolisa oleh bromelin menjadikan kutikula Pinjal ini sudah mulai lentur.

Mekanisme deproteinasi adalah proses hidrolisis dari ikatan-ikatan peptide pada lapisan epikutikula pada bagian lapisan semen yang mengandung senyawa lipoprotein, lapisan polyphenol yang mengandung fenol untuk pembentukan protein yang tahan terhadap asam dan larutan organik, dan lapisan kutikulin yang merupakan lapisan protein yang sangat tipis dengan ketebalan sekitar 0,0075 μm , beberapa terikat secara kovalen dengan lipid membentuk senyawa lipoprotein. Selanjutnya menghidrolisa lapisan prokutikula yang terdiri dari lapisan eksokutikula dan lapisan endokutikula. Lapisan eksokutikula mengandung kitin dan senyawa protein keras atau sklerotin dan lapisan endokutikula mengandung banyak senyawa kitin dan sedikit sklerotin. Kitin memang tidak larut dalam air maupun basa namun karena pecahnya ikatan peptida dalam protein ini akan membuat eksoskeleton serangga menipis.¹³

Degradasi kitin dapat secara biologis yaitu didegradasi oleh serangganya sendiri dengan pergantian kulit atau molting, dapat juga secara fermentasi dengan bantuan mikroba penghasil enzim kitinolitik yang dapat mendegradasi kitin dan dengan cara deproteinisasi, menggunakan berbagai pereaksi seperti Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , Na_2SO_4 , Na_2S , Na_3PO_4 dan NaOH yang lebih banyak digunakan. Perlakuan dengan larutan basa kuat dengan berbagai variasi waktu perendaman. Jika kitin dibiarkan lama di dalam pelarut alkali, kitin hanya sebagian yang mengambang dan tidak larut.¹⁴

Bromelin merupakan suatu enzim endopeptidase yang menghidrolisis ikatan peptida di bagian tengah rantai peptida, yang mempunyai gugus sulfhidril (-SH) pada lokasi aktif yang

dapat menghidrolisa protein menghasilkan asam amino sederhana yang larut dalam air. Sisi aktif enzim bromelin ini mengandung gugus sistein dan histidina yang penting untuk aktivitas enzim tersebut, sehingga enzim ini secara khusus memotong ikatan peptida pada gugus karbonil seperti yang ditemukan dalam arginin atau asam amino aromatik yaitu fenilalanin atau tirosin.¹⁵⁻¹⁷

Berdasarkan dari hasil pengolahan data kualitas kutikula deproteinasi dengan KOH 10%, Bromelin 15%, Bromelin 20%, dan Bromelin 25% yang diperlakukan selama 24 jam dan 48 jam yang sudah diuji statistik Kruskal-Wallis diperoleh ranking tertinggi sampai terendah adalah perlakuan KOH 10% B, KOH 10% A, Bromelin 25% B, Bromelin 20% B, Bromelin 15% B, Bromelin 25% A, dan Bromelin 20% A & 15% A. Tabel 2 menunjukkan berdasarkan rangking perlakuan bromelin konsentrasi 25% merupakan yang tertinggi. Hasil uji statistik dengan nilai sig < 0.05 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan untuk semua perlakuan.

Pada perlakuan KOH 10% A dan B, diperoleh nilai sig $< 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan KOH 10% A dengan KOH 10% B, dan diantara keduanya yang mempunyai kualitas tertinggi pada KOH 10% B. Pada perlakuan Bromelin 15% A dan B, diperoleh nilai sig $> 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan Bromelin 15% A dengan Bromelin 15% B, dan diantara keduanya yang mempunyai kualitas tertinggi pada Bromelin 15% B. Pada perlakuan Bromelin 20% A dan B, diperoleh nilai sig $< 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan Bromelin 20% A dengan Bromelin 20% B, dan diantara keduanya yang mempunyai kualitas tertinggi pada Bromelin 20% B. Pada perlakuan Bromelin 25% A dan B, diperoleh nilai sig $> 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara

perlakuan Bromelin 25% A dengan Bromelin 25% B, dan diantara keduanya yang mempunyai kualitas tertinggi pada Bromelin 25% B.

Berdasarkan dari hasil pengolahan data kualitas kutikula deproteinasi dengan KOH 10%, Bromelin 15%, Bromelin 20%, dan Bromelin 25% yang diperlakukan selama 24 jam dan 48 jam yang sudah diuji statistik Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney diperoleh kualitas tertinggi deproteinasi pada perlakuan KOH 10% B (=8jam) yang merupakan kontrol deproteinasi, sedangkan untuk perlakuan eksperimen, kualitas tertinggi deproteinasi pada perlakuan Bromelin 25% B (= 48 jam), waktu terbaik yang menghasilkan kualitas deproteinasi tertinggi.

SIMPULAN

Konsentrasi optimal bromelin pada proses deproteinasi kutikula pinjal pada konsentrasi 25%. Waktu optimal bromelin pada proses deproteinasi kutikula pinjal pada 48 jam dapat digunakan sebagai alternatif larutan KOH 10 %.

DAFTAR RUJUKAN

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 8th ed. Macmillan, W.H. Freeman, Sapling Learning; 2021.
2. Ratnayani KAA, Juwarni AS, Laksmiwati MAAIA, Dewi IGAKSP. Uji Aktivitas Protease Getah Labu Siam dan Talas Serta Perbandingannya Terhadap Getah Pepaya. *J Kim*. 2015;9(2):147–152.
3. Secor ERJ, Carson WF, Cloutier MM, وآخ. Bromelain Exerts Anti-Inflammatory Effects in An Ovalbumin Induced Murine Model of Allergic Airway Disease. *Cell Immunol*. 2005;237(1):68–75.
4. Rahmat D, Ratih D, Nurhidayati L, Bathini MA. Peningkatan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Dengan Pembentukan Nanopartikel. *J Sains dan Kesehat*. 2016;1(5):214–283.
5. Bahtiyar AY, Efriyadi O, Fitriah E. Efektivitas Kandungan Anti-Bakteri Buah Nanas (*Ananas comosus* L.Merr) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*. *Pros Semnas Sains Entrep IV*. Published online 2017.
6. Nurhayati D, Mulia YS. Efektivitas Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) varietas Subang (Smooth Cayenne) Dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida albicans*. *Poltekkes Bandung*. 2019;73.
7. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. *Int J Infect Dis*. 2010;14(8):667–676.
8. Upik HK, Gunandini D, Soviana S, Sigit S. Penuntun Praktikum Parasitologi Veteriner: Ektoparasit. *Lab Parasitol dan Entomol Kesehat Fak Kedokt Hewan*. Published online 2008.
9. Hidayani A, Ariyadi T, Iswara A. Variasi Konsentrasi KOH dan Waktu Clearing Terhadap Kualitas Preparat Awetan Caplak (Tick)(Variation Concentration of KOH and Clearing Time on The Quality of Microscope Prepared Slide Caplak (Tick)). *Pros Semin Nas Mhs Unimus*. 2018;1:151–154.
10. Nurhayati D, Mulia YS. Isolasi Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.Merr) Dengan Garam Dapur. *J Ris Kesehat*. 2020;12(2).
11. Mathison BA, Pritt BS. Laboratory Identification of Arthropod Ectoparasites. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):48–67.
12. Lawrence AL, Hii SF, Jirsová D, وآخ. Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Vet Parasitol*. 2015;210(3):215–223.
13. Fatihiyah SR. Deproteinasi Kulit Udang secara Fermentasi

- menggunakan Isola Bacillus licheniformis F11 pada Ekstraksi Kitin. *IPB*. Published online 2016.
14. Noviary H. Studi Karakterisasi Pembuatan Kitin dan Kitosan dari Cangkang Belangkas (*Tachypleus Gigas*) untuk Penentuan Berat Molekul. Published online 2010.
 15. Gautam SS, Mishra SK, Dash V, Goyal AK, Rath G. Cooperative Study of Extraction, Purification and Estimation of Bromelain From Stem and Fruit of Pineapple Plant. *Thai J Pharm*. 2010;34(67–66).
 16. Miswar ZF, Sukarmin, Ihsan F. Teknik Karakterisasi Kuantitatif Beberapa Aksesori Nenas. *Bul Tek Pertan*. 2012;17(1):10–13.
 17. Nurhidayah N, Masriany M, Masri M. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Batang Nanas (*Ananas comosus*) Berdasarkan Variasi pH. *Biog J Ilm Biol*. 2013;1(2):116–122.