

PROFIL PROTEIN TIGA JENIS DAGING YANG DILUMURI SERBUK BUAH MENGGKUDU BERBASIS SDS-PAGE

Wa Ode Jariah M¹, Sri Darmawati²

¹Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
email: waodeiyang@gmail.com

²Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
email: ciciekdarma@unimus.ac.id

ABSTRACT

Noni contains protease enzymes that can hydrolyze proteins by breaking the peptide bond, so it can be used to soften the meat. The purpose of this study was to analyze protein profile on 3 types of meat (goats, buffalo and cow) before and after greased with non-fertilizing powder with 30 minutes immersion. Protein profile of three meat types was analyzed using the SDS-PAGE method. The design of this research is descriptive research with the object of research are goat meat, buffalo and cow greased with powder of noni. The results showed that in control meat (goats, buffalo and cow) that were not greased with noni powder there were many major protein bands compared with minor protein bands. While on goat meat, buffalo and cow greased with powder of noni with concentration 10% b / b, 15% b / b, 20% b / b and 25% b / b showed different results at each concentration that there were many minor protein bands than the major protein bands. The higher concentration powder of Noni then the amount of protein in the meat is more denatured. Based on these results indicate that the protease enzyme contained in the powder of noni is able to break peptide bonds in meat protein to protein-shaped minor bands (micromolecul).

Keyword : meat, noni powder, protein profile, SDS-PAGE

1. PENDAHULUAN

Sel hewan dan tumbuhan mengandung unsur protein, tetapi jumlah proteinnya berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hewan mempunyai nilai protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein yang berasal dari tumbuhan karena hewan mempunyai struktur jaringan ikat otot yang hampir sama dengan manusia. Disamping itu protein yang berasal dari hewan lebih tinggi nilainya karena memiliki kandungan asam amino esensial yang lengkap (Sari 2011).

Daging adalah sekumpulan otot yang melekat pada kerangka atau bagian yang sudah tidak mengandung tulang. Hewan yang baru dipotong dagingnya lentur dan lunak, kemudian terjadi perubahan-perubahan sehingga jaringan otot menjadi keras, kaku dan tidak mudah digerakkan, keadaan inilah yang disebut dengan rigor mortis. Daging menjadi lebih alot dan keras ketika sudah dalam kondisi rigor dibandingkan dengan sewaktu baru dipotong, jika dalam keadaan rigor dimasak, akan alot dan tidak nikmat (Harmoin 2010).

Teknologi yang telah dilakukan untuk mengurangi kealotan daging serta meningkatkan kemampuan daging diantaranya dengan menggunakan pengempuk daging (*meat tenderizer*) dan menggunakan enzim protease dari beberapa jenis tanaman. seperti pepaya dan nanas. Selain kedua tanaman tersebut, tanaman lain yang memiliki enzim protease diantaranya buah mengkudu (Rismawati et al. 2016).

Ishartani et al. (2011) telah mengekstraksi dan memurnikan enzim protease dari buah dan daun mengkudu pada dua tingkat ketuaan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa buah mengkudu dengan tingkat ketuaan 2 (memiliki ciri-ciri warna permukaan

kuning kehijauan dan tekstur keras) mengandung protein dalam jumlah paling besar serta memiliki aktivitas enzim protease dengan aktivitas spesifik paling tinggi. Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida (Poliana 2007).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan (Setiati et al. 2013) menunjukkan bahwa inkubasi daging bebek petelur afkir umur 1,7 tahun dengan ekstrak buah mengkudu sebanyak 25% dengan lama perendaman 30 menit dapat meningkatkan keempukan daging rebus serta secara organoleptik disukai. Penelitian juga dilakukan (Rismawati et al. 2016) menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak buah mengkudu dengan konsentrasi 15% sebagai perendam berpengaruh terhadap kualitas fisik (daya ikat air dan keempukan) dan organoleptik (warna, tekstur dan total penerimaan) namun tidak berpengaruh terhadap susut masak, dan organoleptik (aroma dan rasa) daging ayam kampung afkir.

Profil protein pada daging dapat diketahui dengan menggunakan elektroforesis, salah satunya dengan metode SDS-PAGE. Metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gell Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah metode yang dapat memisahkan sub unit - sub unit protein berdasarkan berat molekul, melalui matriks poliakrilamid yang dialiri medan listrik yang bermigrasi dari kutub negatif menuju kutub positif (Darmawati et al. 2012). Tujuan penelitian ini untuk menganalisis profil protein pada 3 jenis daging (kambing, kerbau dan sapi) sebelum dan sesudah dilumuri serbuk buah mengkudu.

2. KAJIAN LITERATUR

Protein merupakan salah satu zat gizi yang terpenting dalam kehidupan. Protein didapatkan dalam sitoplasma pada semua sel hidup. Protein adalah substansi organik dan memiliki kemiripan dengan lemak dan karbohidrat yaitu tersusun atas unsur C (Karbon), H (Hidrogen) dan O (Oksigen). Namun protein memiliki unsur yang tidak dimiliki oleh karbohidrat dan lemak, yaitu unsur Nitrogen. Untuk itu protein merupakan sumber nitrogen satu-satunya bagi tubuh. Protein bagi manusia merupakan zat yang sangat dibutuhkan. Hal ini karena manusia tidak dapat mensintesis protein. Untuk itu diperlukan asupan protein dari luar (Wiarso G 2013).

Nilai gizi pada protein ditentukan oleh kandungan dan daya cerna asam-asam amino esensial. Daya cerna akan menentukan ketersediaan asam-asam amino tersebut secara biologis. Proses pengolahan selain dapat meningkatkan daya cerna suatu protein, dapat pula menurunkan nilai gizinya. Kebutuhan protein setiap manusia adalah 1 g/kg berat badan yang seperempat dari kebutuhan tersebut harus dipenuhi dari protein hewani, salah satunya adalah dari daging (Dalilah 2006)

Daging didefinisikan juga sebagai semua jaringan hewan beserta produk hasil pengolahannya yang dapat dimakan dan tidak menimbulkan gangguan kesehatan bagi yang memakannya. Otot hewan berubah menjadi daging setelah pemotongan karena fungsi fisiologisnya telah berhenti. Otot merupakan komponen utama penyusun daging. Daging juga tersusun dari jaringan ikat, epitel, jaringan-jaringan saraf, pembuluh darah dan lemak (Soeparno 2005).

Keempukan adalah salah satu sifat mutu yang penting pada daging. Daging yang empuk adalah hal yang paling dicari konsumen. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh (Silaban 2009) dengan judul Studi Pemanfaatan Enzim Papain Getah Buah Pepaya untuk Melunakkan Daging menyatakan bahwa pelunakan daging secara kimia dapat dilakukan melalui dua cara yakni secara enzimatik dan non enzimatik, secara enzimatik dapat menggunakan enzim protease sedangkan secara non enzimatik dapat menggunakan asam. Pelunakan menggunakan asam ini sering dilakukan, baik di rumah maupun di restoran, hanya saja dapat mengurangi nilai gizinya karena sebagian protein dapat terdenaturasi atau rusak oleh asam (Wijayanti 2014).

Penggunaan enzim protease pada perendaman daging akan terjadi proses hidrolisis protein serat otot dan tenunan pengikat sehingga terjadi perubahan-perubahan yaitu

menipisnya dan hancurnya sarkolema, terlarutnya nukleus dari serabut otot dan jaringan ikat serta putusnya serabut otot sehingga dihasilkan jaringan yang lunak (Lawrie 2003).

Pengempuk daging dengan menggunakan enzim protease dapat ditemukan di beberapa jenis tumbuhan. Tumbuhan yang paling sering digunakan adalah pepaya dan nenas, karena kedua tanaman tersebut mengandung enzim protease yang disebut papain pada buah pepaya dan bromelin pada buah nanas. Selain pepaya dan nenas tumbuhan lain seperti mengkudu juga telah dilaporkan mengandung enzim protease (Nurlia Kirnanda & Suhairi 2011).

Penggunaan buah mengkudu secara tradisional antara lain untuk obat sariawan, cacing, luka, abses, infeksi mulut dan gusi, sakit gigi, memar, rematik, sakit perut, hipertensi, dan makanan darurat saat kelaparan (Nelson 2006). Pengalaman empiris peternak itik di Brebes menunjukkan daun mengkudu segar mampu meningkatkan kekebalan ternak itik terhadap flu burung (Setiawan 2007), sedangkan di Tonga daun mengkudu digunakan untuk mengobati luka serta melunakkan daging dan gurita (Walter et al. 2002). Manfaat mengkudu sejauh ini belum dikaitkan dengan kandungan enzim di dalamnya. Penggunaan mengkudu secara tradisional sebagai obat luka besar kemungkinan salah satunya disebabkan karena adanya aktivitas protease pada buah tersebut. Sinclair dan Ryan (2007) menjelaskan bahwa protease secara khusus berperan dalam pengaturan pendewasaan sel, perbanyakan sel, serta sintesis dan pergantian kolagen dalam proses penyembuhan luka pada kulit (Ishartani et al. 2011).

Profil protein daging dapat dianalisa menggunakan metode SDS-PAGE. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Arif 2012).

3. METODE PENELITIAN

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perendaman daging kambing, kerbau dan sapi dengan serbuk mengkudu yang berkonsentrasi 10% b/b , 15% b/b , 20% b/b dan 25% b/b dengan lama perendaman 30 menit. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah profil protein daging kambing, kerbau dan sapi. Objek penelitian ini adalah daging kambing, kerbau dan sapi yang direndam serbuk buah mengkudu dengan konsentrasi 10% b/b , 15% b/b , 20% b/b dan 25% b/b dengan lama perendaman 30 menit.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biomolekuler Universitas Muhammadiyah Semarang dan laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada Jogjakarta. Alat yang digunakan yaitu : *oven drying*, blender, mikrotube, mikropipet, *beaker glass*, *erlenmeyer*, *chamber elektroforesis*, *power supply*, sentrifuge, rotator, cawan mortal dan spektrofotometer. Bahan yang dipakai adalah buah mengkudu dibuat dalam bentuk serbuk, daging (kambing, kerbau dan sapi), polyakrilamid 30%, TEMED, APS 10%, SDS 10%, 1,5 M Tris pH 8,8 dan 6,8, *staining coomassie brilliant blue (CBB)*, asam asetat glasial 10%, *biorad assay*, sampel buffer, dan marker protein.

Prosedur penelitian : buah mengkudu dikupas, dipotong kecil dan bijinya dipisahkan , potongan-potongan mengkudu disusun pada loyang pengering dengan rapi, kemudian dimasukkan kedalam tabung *vacum drying* selama 2-3 jam dengan suhu vakum 50-55⁰C. Setelah buah mengkudu kering dilanjutkan dengan memblender kering kemudian diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 100 mesh sehingga menjadi serbuk buah mengkudu.

Perendaman daging dengan serbuk buah mengkudu berkonsentrasi 10% b/b , ditimbang 100 gram daging ditambah 10 gram serbuk buah mengkudu dilumuri selama 30 menit, kemudian sisihkan dan dihaluskan. Dilakukan prosedur yang sama untuk konsentrasi 15% b/b , 20% b/b dan 25% b/b . Sampel kemudian dihaluskan dalam cawan mortir, ditambahkan PBS 1X, dimasukkan daging dalam tabung vonikel dan dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, daging yang telah disentrifus kemudian diambil supernatannya, supernatan tersebut adalah protein. Konsentrasi protein selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer.

Selanjutnya dilakukan metode separasi protein dengan SDS–PAGE disiapkan plat glas, spaser, sisir yang telah dibersihkan dengan detergen dan alkohol 70% untuk pencetak gel. Setelah alat pencetak gel disiapkan, dimasukkan 4 ml larutan 12 % sebagai gel pemisah, kemudian ditambahkan butanol untuk menutup permukaan larutan secukupnya, ditunggu 30-60 menit sampai terjadi polimerisasi. Selanjutnya gel yang telah mengalami polarisasi dipasang pada Biorat mini protein II, kemudian ditambahkan ke dalamnya larutan elektroda bufer pH 8,3. Sampel disiapkan, sampel ditambah 5x sampel bufer dengan perbandingan 4:1(v/v) setelah itu campuran tersebut dipanaskan selama 2 menit di dalam air yang telah mendidih, setelah itu langsung diletakkan di dalam es. Sampel selanjutnya siap dimasukkan ke dalam gel, setelah itu diberi aliran listrik. Gel diambil, selanjutnya diwarnai dengan 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 selama 30-60 menit hingga pita-pita protein terwarnai. Selanjutnya untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung protein diberi larutan destaining, larutan destaining diganti 3-4 kali hingga gel tampak bersih. Kemudian untuk menentukan berat molekul protein yang diinginkan dihitung R_f nya dan diplotkan pada grafik logaritmik dari R_f marker protein yang berat molekulnya telah diketahui. (Darmawati et al. 2012)

4. HASIL PENELITIAN

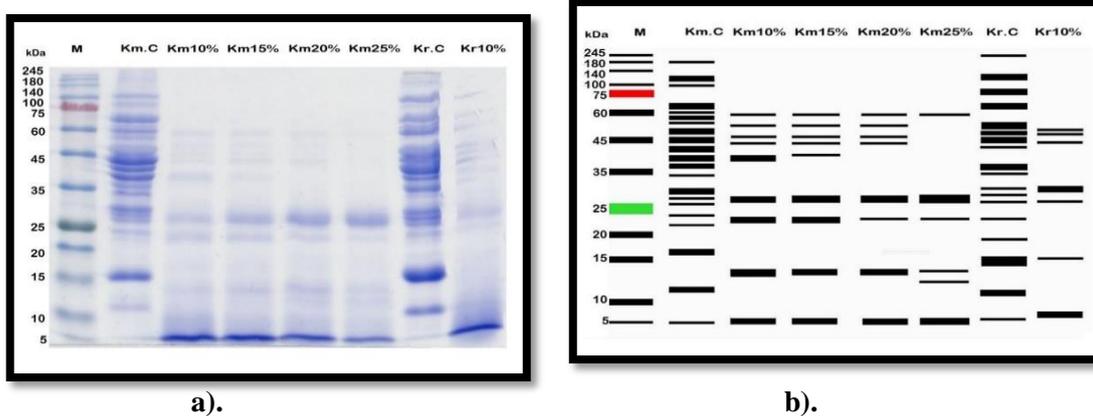
Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daging kambing, daging kerbau dan daging sapi yang dilumuri serbuk buah mengkudu dengan konsentrasi 10% b/b , 15% b/b , 20% b/b dan 25% b/b selama 30 menit dan daging yang tidak dilumuri sebagai kontrol.

Tabel 1. Total protein daging sebelum dan sesudah dilumuri serbuk buah mengkudu

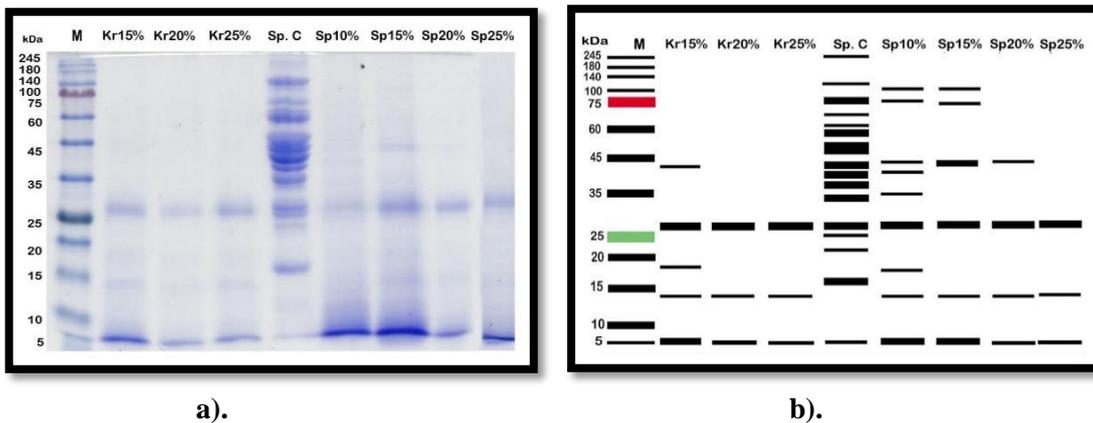
Jenis Daging	Total Protein dalam $\mu\text{g}/\mu\text{l}$				
	Kontrol	10%	15%	20%	25%
Kambing	21.76	6.75	5.37	4.59	3.67
Kerbau	18.64	9.75	8.49	7.11	6.64
Sapi	29.22	7.84	6.34	4.70	3.93

Dari hasil spektrofotometri daging kontrol memiliki total protein yang lebih besar dibandingkan dengan daging yang dilumuri serbuk buah mengkudu. Total protein daging yang tertinggi ialah daging sapi sebesar 29.22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan terendah adalah daging kerbau sebesar 18,64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Sedangkan daging yang dilumuri serbuk buah mengkudu memiliki total protein yang lebih rendah dibandingkan daging kontrol. Total protein daging dipengaruhi oleh jumlah penambahan serbuk buah mengkudu, semakin tinggi penambahan serbuk buah mengkudu maka total protein daging semakin menurun hal ini disebabkan enzim protease yang terkandung dalam serbuk buah mengkudu. adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein dan dapat mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat (Ward 1983).

Analisis profil protein terhadap daging kambing, kerbau dan sapi yang sudah dilumuri serbuk buah mengkudu dilakukan dengan metode SDS-PAGE menunjukkan hasil sebagai berikut:



Gambar 1. (a) Hasil SDS-PAGE gel 1, (b) Visualisasi representasi pita protein Gel 1



Gambar 2. (a) Hasil SDS-PAGE gel 2, (b) Visualisasi representasi pita protein Gel 2

Keterangan gambar :

- M : Marker
- Km.C : Daging kambing control
- Km 10% : Daging kambing dilumuri serbuk 10%
- Km 15% : Daging kambing dilumuri serbuk 15%
- Km 20% : Daging kambing dilumuri serbuk 20%
- Km 25% : Daging kambing dilumuri serbuk 25%
- Kr.C : Daging kerbau control
- Kr 10% : Daging kerbau dilumuri serbuk 10%
- Kr 15% : Daging kerbau dilumuri serbuk 15%
- Kr 20% : Daging kerbau dilumuri serbuk 20%
- Kr 25% : Daging kerbau dilumuri serbuk 25%
- Sp.C : Daging sapi control
- Sp 10% : Daging sapi dilumuri serbuk 10 %
- Sp 15% : Daging sapi dilumuri serbuk 15%
- Sp 20% : Daging sapi dilumuri serbuk 20%
- Sp 25% : Daging sapi dilumuri serbuk 25%

Berat molekul protein diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya dengan cara membandingkan nilai retardation factor (Rf) menggunakan rumus (Fatchiyah et. al 2011) :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Tabel 2. Rf dan Berat molekul marker

Jarak Marker	Rf Marker	Berat molekul marker (kDa)
0.1	0.02	245
0.2	0.04	180
0.3	0.06	140
0.5	0.09	100
0.7	0.13	75
1.1	0.21	60
1.6	0.30	45
2.2	0.41	35
2.9	0.54	25
3.4	0.64	20
4.0	0.75	15
4.7	0.89	10
5.3	1.0	5

Untuk mengetahui Berat Molekul Sampel (BM). Rf yang sudah diketahui nilainya diplotkan pada grafik logaritmik dengan BM (Marker) yang sudah diketahui nilainya.

Tabel 3. Hasil analisis dan Berat molekul sampel

Jenis sampel	Pita protein sampel	Berat Molekul (kDa)
Km.C	11 pita mayor	100,68,57,48,45,42,38, 34,28,15 dan 11 kDa.
	10 pita minor	180,88,60,54,32,26,25,24,22, dan 5 kDa.
	5 pita mayor	38,26,23,14 dan 5 kDa
Km 10%	4 pita minor	57,51,45 dan 43 kDa
	4 pita mayor	26,23,14 dan 5 kDa
Km 15%	5 pita minor	57,51,48,45 dan 43 kDa
	3 pita mayor	26,14 dan 5 kDa
Km 20%	5 pita minor	51,45,43,42 dan 23 kDa
	2 pita mayor	26 dan 5 kDa
Km 25%	4 pita minor	57,23,14 dan 13 kDa
	9 pita mayor	120,72,68,51,48,43,35,17,dan 11 kDa
Kr.C	9 pita minor	245,38,34,29,28,25,23,19 dan 8 kDa
	2 pita mayor	29 dan 9 kDa
Kr 10%	5 pita minor	48,45,42,25 dan 17 kDa
	2 pita mayor	27 dan 5 kDa
Kr 15%	3 pita minor	43,18 dan 14 kDa
	1 pita mayor	27 kDa
Kr 20%	2 pita minor	14 dan 5 kDa
	1 pita mayor	27 kDa
Kr 25%	2 pita minor	14 dan 5 kDa
	9 pita mayor	75,56,49,42,40,37,33,27 dan 16 kDa
Sp.C	7 pita minor	245,120,68,60,24,22 dan 5 kDa
	2 pita mayor	27 dan 5 kDa
Sp 10%	7 pita minor	100,71,43,38,33,17 dan 14 kDa
	3 pita mayor	43,27 dan 5 kDa
Sp 15%	3 pita minor	100,71 dan 5 kDa
	1 pita mayor	27 kDa
Sp 20%	3 pita minor	43,14 dan 5 kDa
	1 pita mayor	27 kDa
Sp 25%	2 pita minor	14 dan 5 kDa

Enzim protease dalam buah mengkudu merupakan biokatalisator yang dapat mempercepat laju reaksi hidrolisis protein di dalam daging. Bennion (1980) yang dikutip Utami, Pudjomartatmo, dan Nuhriawangsa (2011) menyatakan bahwa hidrolisis protein miofibril terjadi pada filamen-filamen protein yang mengakibatkan terjadinya fragmentasi miofibril. Pemutusan serat-serat daging dan pengurangan jaringan ikat yang mengikat antar serat menyebabkan integritas serat-serat daging berkurang. Akibatnya keempukan daging akan meningkat. Kinerja enzim protease dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, semakin tinggi konsentrasi enzim protease, semakin banyak pula protein dalam daging yang dihidrolisis (Setiati et al. 2013).

5. SIMPULAN

Berdasarkan hal tersebut penambahan enzim protease yang terdapat dalam serbuk buah mengkudu pada daging kambing, kerbau dan sapi akan memutus ikatan peptida pada protein daging menjadi mikromolekul yang lebih sederhana sehingga daging akan menjadi lebih lunak. Adanya perbedaan konsentrasi serbuk buah mengkudu akan menunjukkan hasil yang berbeda yaitu semakin tinggi konsentrasi serbuk buah mengkudu maka jumlah protein pada daging akan terdenaturasi.

Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian lebih lanjut dengan perendaman menggunakan bagian lain dari tanaman mengkudu dan bagi masyarakat untuk melunakkan daging dapat menggunakan serbuk buah mengkudu.

6. REFERENSI

- Arif, M., 2012. Profil Sds-Page Outer Membrane Protein *Porphyromonas gingivalis*. *Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember*
- Darmawati, S., Haribi, R. & Anwar, S., 2012. Analisis Molekuler Profil Protein Pilli untuk Mengungkap Hubungan Similaritas 26 Strain *Salmonella typhi* Isolat Jawa. *Prosiding Seminar Unimus. Jurnal Universitas Muhammadiyah Semarang*.
- Dalilah, E., 2006. Evaluasi Nilai Gizi Dan Karakteristik Protein. *Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor*
- Fatchiyah, Arumingtyas Estri Laras, Widyarti Sri, Rahayu Sri, 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta
- Harmoin, I., 2010. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Permintaan Daging Sapi Di Indonesia pada tahun 2000-2009. *UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*.
- Ishartani, D., Andarwulan, N. & Syah, D., 2011. Pemurnian Protease dari Buah dan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor*
- Nurlia Kirnanda, A. & Suhairi, L., 2011. Pengaruh Perendaman dalam Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Karakteristik Organoleptik Daging Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). *Universitas Syiah Kuala*.
- Poliana J, MacCabe AP. 2007. *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications*. Dordrecht: Springer. Halaman:174. [ISBN 978-1-4020-5376-4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5376-4)
- Rismawati, Eka, W. & Kusmayadi, S., 2016. Pengaruh Kosentarsi Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai Perendam Daging Ayam Kampung Afkir terhadap Kualitas Fisik dan Organoleptik. *Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran*
- Sari, M., 2011. Identifikasi Protein Menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR). *Universitas Indonesia*.
- Setiati, Y., Ridawati & Alsuhendra, 2013. Pengaruh Perendaman dalam Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Kualitas Sensori Daging Bebek Afkir. Skripsi, *Fakultas Teknik, Universitas Negeri Jakarta*
- Utami, D.P., 2010. Pengaruh Penambahan Ekstrak Buah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dan Waktu Pemasakan yang berbeda terhadap Kualitas Daging Itik Afkir. *Fakultas*

- Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta*
- Ward, O.P. (1983). Proteinase. In Forgoty, W. M. (ed). *Microbial Enzyme and Biotechnology*. Appl. Sci. *Publisher*. London.
- Wijayanti, Dian. 2014. *Uji Kadar Protein Dan Organoleptik Daging Sapi Rebus Yang Dilunakkan Dengan Sari Buah Nanas (Ananas Comosus)*. Skripsi. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah, Surakarta.