

**PENENTUAN WAKTU FERMENTASI DAN pH OPTIMUM AKTIVITAS
PROTEASE DARI HASIL FERMENTASI CAMPURAN MENGKUDU
(*Morinda citrifolia* L), NANAS (*Ananas comosus* L), PISANG (*Musa
paradisiaca* L) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI**

Edy Agustian Yazid^{*}, Zahrotus Sa'diyah

^{*}Akademi Analisis Kesehatan Delima Husada Gresik

ABSTRACT

*Fermentation is one of the bioconversions to produce anaerobic microbes that are beneficial and can produce enzymes. One of the enzymes that can be produced in the fermentation process is Protease. Fruit mixed fermentation is a production effort of protease enzymes that can be done simply. The purpose of this research is to know the time of fermentation and pH Optimum of protease enzyme activity from fermentation result of mixture of Noni fruit (*Morinda citrifolia* L.), pineapple (*Ananas comosus* L.) and banana (*Musa paradisiaca* L.).*

This research was conducted experimentally with quantitative analysis technique. Characteristics observed were 7 days, 15 days, 30 days and pH 4, 5, 6. The test of protease enzyme activity was done by using Spectrophotometric method which measured enzyme activity at 578 nm wavelength.

*The results of the activity test showed the highest activity at 30 days fermentation time at pH 5 which was 4,491,7441 U / mL. From the results of the research, it can be concluded that Crude protease enzyme produced from fermentation of *Morinda citrifolis* L., pineapple (*Ananas comosus* L.) and banana (*Musa paradisiaca* L.) produce a high protease enzyme.*

Keyword: Fermentation, Enzyme Activity, Protease Enzyme, Spectrophotometry.

PENDAHULUAN

Enzim adalah biokatalisator yang berfungsi sebagai katalis dalam proses biologis (Lehninger, 1982). Salah satu enzim yang dikenal luas penggunaannya adalah enzim protease yang merupakan enzim hidrolitik pemecah senyawa makromolekul protein (Page, 1989). Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease memegang peranan penting dalam berbagai reaksi biokimia yang terjadi dalam organisme hidup termasuk degradasi protein menjadi asam-asam amino dan peptida sehingga dapat digunakan sebagai nutrisi (Fujiwara & Masui, 1993). Protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Secara komersial protease menduduki urutan tertinggi di antara enzim lainnya dan mencakup lebih dari 60% total penjualan enzim (Adinaraya, dkk., 2003). Protease digunakan pada beberapa industri seperti detergen, farmasi, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan, dan proses pengolahan limbah industri (Martin & Nascimento, 2006).

Kebutuhan enzim protease yang terus meningkat dan produksi belum mencukupi mendorong usaha-usaha pencarian alternatif baru sumber enzim protease. Mikroorganisme, jaringan hewan dan tanaman adalah sumber dari enzim protease. Pencarian sumber enzim protease dari mikroorganisme mempunyai beberapa resiko yaitu kemungkinan mikroorganisme tersebut mengandung racun, terutama jika enzim

tersebut diaplikasikan dalam bidang pangan. Selanjutnya, jaringan hewan secara ekonomi tidak menguntungkan untuk dijadikan sebagai sumber enzim protease. Oleh karena itu, para peneliti lebih memfokuskan mencari sumber baru enzim protease dari tanaman (Zaed, 2010).

Tanaman merupakan sumber enzim protease terbesar (43,85%) diikuti oleh bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan virus (4,41%) (Mahajan dan Khansant, 2010). Enzim protease dari tanaman memiliki spesifisitas substrat yang luas, aktivitas dan stabilitas yang tinggi pada berbagai variasi temperatur, pH, ion logam, inhibitor serta pelarut organik. Hal ini membuat protease dari tanaman merupakan pilihan yang sangat baik untuk industri makanan, medis, bioteknologi dan farmakologi (Mehnoush et. al., 2011). Enzim dari tumbuhan pada tahun 2008 menempati 5% dari total market share enzim (Illanes, 2008). Selama ini yang banyak digunakan sebagai sumber enzim protease adalah tanaman, padahal buah-buahan juga memiliki potensi yang besar sebagai sumber alternatif enzim protease. Buah-buahan selain mengandung vitamin dan mineral juga mengandung zat yang tidak kalah penting yaitu enzim protease yang berperan membantu pencernaan dan penyerapan (Witjaksono, 2012). Beberapa buah-buahan yang mengandung enzim protease adalah kiwi, pepaya dan melon (Noda et.al., 1994). Selain buah tersebut enzim protease juga bisa didapatkan dari buah mengkudu (Ishartani, dkk 2011), nanas (Kurniawan, dkk 2013) dan pisang (Gana, et. al., 2014).

Buah-buahan yang difermentasi dapat menghasilkan enzim, yang merupakan hasil dari ekskresi dan metabolisme dari mikroba. Hal ini karena fermentasi merupakan proses biokonversi yang menghasilkan mikroba anaerob yang menguntungkan dan menghasilkan enzim. Metode yang banyak digunakan untuk produksi enzim adalah submerget fermentation (Riwayati et. al. 2012) dan gula adalah bahan yang umum digunakan dalam fermentasi.

Berdasarkan uraian diatas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang “Penentuan Waktu Fermentasi Dan Ph Optimum Aktivitas Protease Dari Hasil Fermentasi Campuran Mengkudu (*Morinda citrifolia* L), Nanas (*Ananas comosus* L), Pisang (*Musa Paradisiaca* L) Dengan Metode Spektrofotometri”.

BAHAN DAN METODE

Untuk mengetahui aktivitas enzim protease dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.) dilakukan penelitian eksperimental. Karakteristik yang diamati adalah variasi waktu fermentasi yaitu 7 hari, 15 hari 30 hari dan pH 4, 5, 6 dengan menggunakan metode spektrofotometri (Bergmeyer & Grassi, 1983).

Uji Aktivitas Enzim Protease

Prosedur singkat untuk menguji aktivitas enzim protease (Bergmeyer & Grassi, 1983) dapat dilihat dari Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Prosedur Uji Aktivitas Enzim Protease

Perlakuan	Blanko	Standart	Sampel
Kasein 1% pH 7,0	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Buffer phospat (pH awal fermentasi, pH diatas pH awal fermentasi dan pH dibawah pH awal fermentasi)	0,2 ml	-	-
Tirosin 5 mM	-	0,2 ml	-
Sampel (substrat hasil fermentasi)	-	-	0,2 ml
Dipanaskan dalam penangas air suhu 40°C selama 5 menit			
TCA 0,1 M	2 ml	2 ml	2 ml
Buffer phospat (pH awal fermentasi, pH diatas pH awal fermentasi dan pH dibawah pH awal fermentasi)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dicentrifuge 3000 rpm selama 10 menit			
Dipipet supernatan dari masing-masing tabung sebanyak 0,6 ml			
NaOH 1M	2 ml	2 ml	2 ml
Larutan follin	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Ketiga tabung divortex, kemudian masing-masing tabung di encerkan dalam labu ukur 10 ml, lalu didiamkan selama 5 menit			
Dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm			

Hasil serapan uji aktivitas pH dan suhu diukur dengan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas proteolitik} = \frac{A_{si} - A_b}{A_s - A_b} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{V_{si}} \times F_p = U/ml$$

Keterangan :

- A sampel = Absorbansi sampel
 - A standart = Absorbansi standart
 - A blanko = Absorbansi blanko
 - t = Waktu inkubasi
 - Vsampel = Volume sampel yang diambil
 - Fp = Faktor pengenceran
- (Rosdianti, 2008)

HASIL DAN PEMBAHASAN

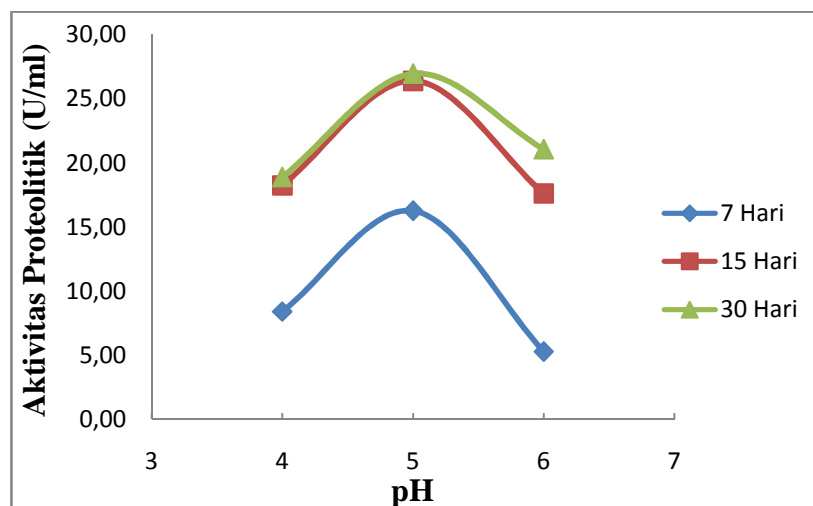
Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu uji aktivitas enzim protease dengan variasi waktu fermentasi dan pH yang diperoleh dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.) diperoleh hasil yang tercantum dalam Tabel 2.

Tabel 2. Data Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease dengan Variasi Waktu Fermentasi dan pH.

Waktu Fermentasi	pH	Serapan			
		Blanko	Standart	Sampel	Aktivitas enzim (U/ml)
7 Hari	4	0,042	0,1505	0,2245	8,4103
	5	0,021	0,0885	0,2405	16,259
	6	0,027	0,343	0,3605	5,2768
15 Hari	4	0,118	0,1535	0,2475	18,2394
	5	0,2515	0,2855	0,431	26,3970
	6	0,264	0,3135	0,4385	17,6262
30 Hari	4	0,125	0,3745	1,0675	18,8877
	5	0,226	0,3875	1,0965	26,9504
	6	0,2345	0,4425	1,1105	21,0576

Dari data hasil penelitian yang ada pada tabel 5.1 diatas, dapat dibuat grafik yang menggambarkan hasil pengukuran aktivitas enzim protease dengan variasi waktu fermentasi dan pH sebagai berikut :



Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas enzim protease dengan metode spektrofotometri (Bergmeyer & Grassi, 1983) pada crude enzim protease dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.) menunjukkan adanya aktivitas enzim protease yang tinggi.

Aktivitas enzim protease tertinggi ditetapkan optimasinya berdasarkan parameter waktu fermentasi dan pH. Hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi dari waktu fermentasi 7 hari, 15 hari dan 30 hari dengan variasi pH 4, 5 dan 6 diperoleh hasil aktivitas tertinggi yaitu pada waktu fermentasi 30 hari pada pH 5 yaitu sebanyak 26,9504 U/mL.

Hasil analisis menunjukkan bahwa waktu fermentasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease yang dihasilkan dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.). Pengaruh waktu fermentasi ini telah dibuktikan dalam penelitian

terdahulu oleh Rajan & Nair (2011). Dimana dalam penelitian tersebut memperlihatkan bahwa aktivitas enzim lipase akan meningkat sampai aktivitas maksimumnya dan setelah itu akan mengalami penurunan, sama halnya dengan aktivitas enzim protease dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.), dalam penelitian ini aktivitas terus meningkat sampai hari ke 30 fermentasi. Kenaikan enzim protease akan terus meningkat sampai tercapai aktivitas maksimum. Dimana fermentasi sempurna memerlukan waktu hingga 3 bulan tanpa sinar matahari (Sumarlin, 2013).

pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam menghasilkan suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif dalam mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional. Aktivitas enzim yang menurun karena perubahan pH disebabkan oleh perubahan keadaan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuaterner enzim aktif (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

Pada penelitian ini pH optimum yang dihasilkan dari fermentasi buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.) adalah pH 5 yang merupakan pH awal yang terbentuk saat fermentasi. pH optimum suatu enzim berbeda-beda tergantung dari sumber enzim tersebut. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan Yusriah & Kuswytasari (2013) aktivitas protease yang dihasilkan pada *Penicillium* sp. mendapatkan aktivitas protease optimum pada pH 8 sedangkan penelitian Aryati (2008), enzim bromelin (protease) dari ekstrak bonggol nenas memiliki pH optimum 5,0 .

Minuman hasil fermentasi campuran buah mengkudu, nanas dan pisang memiliki manfaat yang sangat besar bagi kesehatan terutama bagi kesehatan pencernaan hal ini dikarenakan selain mengandung enzim protease yang baik untuk metabolisme protein, bahan makanan yang telah mengalami fermentasi mempunyai kandungan dan kualitas gizi yang lebih baik dari bahan asalnya karena mikroba bersifat katabolik atau memecah komponen-komponen kompleks menjadi zat-zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna. Disamping itu mikroba dapat pula menghasilkan asam amino dan beberapa vitamin seperti riboflavin, vitamin B12, provitamin A, dapat menghasilkan flavour yang lebih disukai dan dapat mengurangi racun/anti nutrisi yang terdapat pada bahan (Carlile dan Watkinson, 1995).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian penentuan waktu fermentasi dan pH optimum uji aktivitas enzim protease yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Crude enzim protease yang dihasilkan dari hasil fermentasi campuran buah mengkudu (*Morinda citrifolis* L.), nanas (*Ananas comosus* L.) dan pisang (*Musa paradisiaca* L.) menghasilkan enzim protease.
2. Aktivitas enzim protease tertinggi adalah pada waktu fermentasi 30 hari pada pH 5 yaitu sebanyak 26,9504 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., P. Ellaiah and D.S. Prasad. 2003. *Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated Bacillus subtilis PE-11*. *AAPS PharmSchiTech*. 2003;4(4): article 56.
- Anna Poedjiadi. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*, UI Press, Jakarta.
- A.P. Bangun., B. Sarwono. 2002. *Khasiat dan Manfaat Mengkudu*. Jakarta: Agro Media Pustaka.
- August, E. G. 2000. *Kajian Lipase Amobili dari Aspergillus niger pada Pembuatan MAG yang Bersifat Antibakteri dari Minyak Kelapa*. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Bergmeyer H.U and Grassi M. 1983. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. V: Enzymes 3 : peptidases, proteinases and their inhibitors. VCH Verlagsgesellschaft MBH, Weinheim.
- Buckle, K. A., dkk. 1985. *Ilmu Pangan*. Terjemahan oleh H. Purnomo dan Adiono, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Carlile, M.J and S.C. Watkinson. 1995. *The Fungi*. Academic Press Inc.London.
- Chairunnisa, H. 1988. *Isolasi Enzim Bromelin Kasar dari Bonggol Nenas. Simposium Bioproses dalam Industri Pangan*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Creighton, H. 1986. *Law Every Nurse Should Know*. Philadelphia:W.B. Saunders.
- Crueger, W.& Crueger A. 1984. *Biotechnology, A Text Book of Industrial Microbiology*. Sinaeur Associates, Inc. Sunderland
- Djauhariya E. 2003. *Mengkudu (Morinda citrifolia L) Tanaman Obat Potensial. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. J Pengemb. Tek. TRO*. 15(1) : 1-16.
- Djauhariya, E., Rahardjo, M., Ma'mun. 2006. *Karakterisasi Morfologi dan Mutu Buah Mengkudu. Bul. Plasma Nutf*. Vol.12 No.1.
- Fujiwara, N And Masui, A. 1993, *Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic Bacillus sp.*, *J. Biotech.*,30, 245-256.
- Gana, N.H.T., Mendoza, B.C dan Monsalud, R.G. 2013. *Isolation, Screening and Characterization of Yeasts with Amyolytic, Lipolytic, and Proteolytic Activities from the Surface of Philippine Bananas (Musa spp.)*, *Philippine Journal of Science* 81, 143 (1): 81-87.
- Illanes A. 2008. *Enzyme production*. Springer, Valparaiso.
- Ishartani, D., Elfi, Nuri, W. dan Darul, S. 2011. *Pemurnian Protease dari Buah dan Daun Mengkudu (Morinda citrifolia L.)*, *Jurnal Teknol dan industri Pangan*, Vol. XXII No.1.
- Kurniawan, R. , S. Juhanda, Aditia, N., Irfan, D. 2013. *Isolasi Enzim Bromelin dalam Serbuk dari Buah Nanas*, *Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta, 5 Maret 2013.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga, Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1990. *Principles of Biochemistry*. Pent. M. Thenawijaya. Jilid 2. Surabaya: Erlangga.
- Lehninger, A.L. 1995. *Dasar-dasar Biokimia I*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia, Jilid I*. Diterjemahkan oleh Thenawidjaya. Erlangga, Jakarta.
- Lidya, B dan N. S Djenar. 2000. *Dasar Bioproses*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi DEPDIKNAS, Jakarta.

- Lingga, L. 2012. *The Healing Power of Antioxidant: Mengenal Lebih Jauh Sumber Antioksidan Unggulan*. Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Macedo, G.A., Park, A.k. and Pastore, G.M. 1997. *Partial purification and Characterization of an extracellular lipase from newly isolated strain of Geotrichum sp.* *Rev. Microbiol.* 28(2): 90-95.
- Mahajan, R. T. dan Shamnkant, B.B. 2010. *Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review, India J. Pharm., research*, 3(9), 2048-2068.
- Martins, M.L.L dan Nascimento, W.C.A. 2006. *Studdies on stability of protease from Bacillus sp. and its compatibily with commercial detergent*. Brazilia. *Microbiol.* 37: 307-311.
- Maurer, H.R.. 2001. *Bromelin: biochemistry, pharmacology and medical use. J. Cellular and Molecular Life Science (CMLS)* 58 (9):xx-xx
- Mehrnous et. al.. 2011. *Optimization of the Conditions for Extraction of Serine Protease from Kesinai Plant (Streblus asper) Leaves Using Response Surface Methodology, J. Mol., 2011*, 16: 9245-9260.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1993. Some observation on protease producing incontinuous suspenstion cultures of Bacillus firmus. *Biotech.* 41 ; 43-54.
- Muhidin, Dudung. 1999. *Agrobisnis Papain dan Pektin*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Muriel P., Quintanar ME and Perez AW. 1998. *Effect of Colchicine on acetaminopen induced liver damage Biochemical Pharmacology.* 37:4127-4135.
- Nelson SC. 2006. *Some Traditional and Modern Uses of Noni*.
- Nuryati, S. 2003. *Absorpsi Senyawa gula pada Intestinum Ayam (Gallus sp.) setelah Pemberian Mengkudu Dalam Ransum*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Ngili, Yohannes. 2009. *Biokimia Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Graha Ilmu: Yogyakarta.
- Noda, K., Koyanagi, M and Kayami, C. 1994. *Purification and Characterisation of an Endoprotease from Melon Fruits*. *J. Food Sci*, 59 (3), 585-587.
- NOVO enzyme information .1981. *Novo Enzymes in the Produktion of Ethanol from Start Containing Crops*. Novo Brochure IB-238c-GB.Hal.2
- Nurhayani. 2000. *Peningkatan Kandungan Protein Kulit Umbi Ubi Kayu Melalui Proses Fermentasi. Vol 6. JMS*.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 465 halaman.
- Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia (Terjemahan)*. Erlangga, Jakarta.
- Pawiroharsono S. 2007. Artikel. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Pohan, H.G. dan N.T. Antara. 2001. Pengaruh penambahan madu dan asam sitrat terhadap karakteristik minuman fungsional dari sari buah mengkudu. *Forum Komunikasi IHP* (4): 11–20.
- Poliana J, MacCabe AP. 2007. *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications*. Springer, Dordrecht.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi farmasi*. Erlangga, Jakarta : 150 – 171.
- Putri, Y.N. 2007. *Mempelajari Pengaruh Penyimpanan Tape Ketan (Oryza sativa glutinosa) Terhadap Daya Terima Konsumen*, Skripsi, IPB, Bogor.
- Rahayu, K.S. 2004. *Industrialization of Tempe Fermentation. In Industrialization of Indigenous Fermented Food*. Steinkraus, K.H. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Rajan, A., Nair J. 2011. *A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated Aspergillus fumigatus MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. Turk J Biol.* 35: 569574.

- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S and Deshpande, V.V. 1998. *Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Review* 62:597-635.
- Riadi, Lieke. 2007. *Teknologi Fermentasi*. Edisi Ke-1. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Riwayati, I., Hartati, I dan Kurniasari, L. 2012. *Teknologi Imobilisasi Sel Mikroorganisme Pada Produksi Enzim Lipase*, Karya Tulis Ilmiah, Fakultas Teknik Kimia Universitas Wahid Hasyim. Tahun XXXXII, Semarang.
- Rosdianti, I. 2008. *Pemanfaatan Enzim Pepain Dalam Produksi hidrolisat Protein Dari Limbah Industri Minyak Kelapa*, Skripsi, Institut Pertanian Bogor.
- Saktiwansyah, E. 2001. *Karakterisasi Enzim Lipase Intraseluler dengan Aktivitas Esterifikasi dari Kapang Rhizopus oryzae TR 32*, Tesis, Program Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Sanago, T. Paquet and Linden. 1990. *Proteolysis Casein by Papain in a Complex Environment Influence of Ionic Strength on The Reaction Product. J. Food Sci.*, 55 (3), 796-800.
- Satrija F, Retnani EB, Ridwan Y, Tiuria R. 2001. *Potential use of herbal anthelmintics as alternative antiparasitic drugs for small holder farm in developing countries*. Copenhagen: Proceedings of the 10th Conference of the Association of Institution for Tropical Veterinary Medicine.
- Septiatin, A, 2009, *Apotik Hidup dari Rempah-Rempah dan Tanaman Liar*, CV.Yrama Widya: Bandung
- Sinclair RD, Ryan TJ. 2007. *Proteolytic enzymes in Wound healing : the role of enzymatic debridement. Aust. J Derm* 35(1):35-41