21 (2) (2026) 88-100

Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian

http://journals.usm.ac.id/index.php/jtphp

Desain Box-Behnken Untuk Optimasi Aktivitas Bromelain Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) Metode Pengendapan Garam Himalaya

Novriyanti Lubis[1]*, Salman Alfarizi[1], Aulia Milatina[1], Ima Sukmawati[1], Nurhabibah[1]

[1]Prodi Farmasi FMIPA, Universitas Garut

DOI: https://doi.org/10.26623/jtphp.v21i2.13149.

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Disubmit 10 Februari 2026
Direvisi 11 Maret 2026
Disetujui 15 Agustus 2026

Keywords: Pineapple (Ananas comosus L. Merr), bromelain enzyme, box-behnken design

Abstrak

Bromelain merupakan enzim protease yang terdapat pada buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dan berfungsi menghidrolisis protein menjadi peptida rantai pendek dan asam amino. Selain memiliki aktivitas proteolitik tinggi, bromelain juga menunjukkan potensi aplikasi luas dalam industri pangan, farmasi, dan bioteknologi, sehingga optimalisasi aktivitas enzimnya menjadi penting untuk dikaji lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan aktivitas enzim bromelain dari buah nanas secara keseluruhan termasuk kulit, buah, dan bonggolnya, menggunakan metode pengendapan garam himalaya. Pengujian aktivitas enzim bromelain metode Murachi menunjukkan hasil aktivitas tertinggi pada konsentrasi 40% dengan hasil 0,0509 U/mL. Untuk mengoptimalkan proses, digunakan perangkat lunak *Design Ekspert 13* desain *box-behnken* untuk menganalisis hubungan antara faktor-faktor seperti konsentrasi, pH dan waktu perendaman dengan respon rendemen dan uji keempukan, kemudian dianalisis dengan ANOVA untuk memperoleh formula optimum, dengan hasil nilai *desirability* 0,538. Uji keempukan menggunakan durometer menunjukkan adanya penurunan nilai, menandakan bahwa enzim bromelain berperan dalam meningkatkan keempukan daging melalui mekanisme degradasi protein pada jaringan ikat dan miofibril.

Abstract

Bromelain is a protease enzyme found in pineapple (Ananas comosus L. Merr*) and functions to hydrolyze proteins into short-chain peptides and amino acids. In addition to having high proteolytic activity, bromelain also shows broad application potential in the food, pharmaceutical, and biotechnology industries, so that optimization of its enzyme activity is important for further research. This study aims to optimize the bromelain enzyme activity of pineapple fruit as a whole including the skin, fruit, and corm, using the Himalayan salt precipitation method. The bromelain enzyme activity test using the Murachi method showed the highest activity results at a concentration of 40% with a result of 0.0509 U/mL. To optimize the process, Design Ekspert 13 software was used with a box-behnken design to analyze the relationship between factors such as concentration, pH and soaking time with the yield response and tenderness test, then analyzed by ANOVA to obtain the optimum formula, with a Desirability value of 0.538. The tenderness test using a durometer showed a decrease in value, indicating that the bromelain enzyme plays a role in increasing meat tenderness through a protein degradation mechanism in connective tissue and myofibrils.*

✉ Alamat Korespondensi:
E-mail: novriyantilubis@uniga.ac.id

p-ISSN 1693-9115
e-ISSN 2580-846X

PENDAHULUAN

Buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) adalah salah satu tanaman buah unggulan yang banyak dibudidayakan di Indonesia, dan seluruh bagiannya mulai dari buah, kulit hingga bonggolnya memiliki banyak manfaat. Karena potensi pengelolaan buah nanas menjadi prioritas pengembangan nasional (Prasetyo, Wijana and Pradnyawathi, 2023).

Bromelain adalah enzim protease ekstraseluler yang terdapat dalam nanas (*Ananas comosus* L. Merr). Enzim ini berfungsi memecah (hidrolisis) protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino.Proses memperoleh ekstrak kasar bromelain dari buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) biasanya diisolasi menggunakan metode berdasarkan kelarutan, seperti pengendapan dengan pelarut organik atau garam sebagian besar waktu dalam proses isolasi enzim dihabiskan untuk menguji aktivitasnya, yang mana aktivitas tersebut sangat berpengaruh pada kondisi lingkungan seperti suhu, pH, dan konsentrasi. Oleh karena itu, untuk mendapatkan perbandingan yang valid, pengujian aktivitas enzim harus selalu dilakukan dengan metode khusus dan kondisi yang konsisten. Penambahan garam ke dalam larutan enzim akan menurunkan kelarutan enzim, sehingga menyebabkan mengendap atau menggumpal. Mekanisme ini terjadi karena ion-ion garam memiliki kemampuan untuk mengikat molekul air lebih kuat dari pada molekul protein. Akibatnya, air yang ada menjaga protein larut menjadi menurun. Kekurangan air ini membuat molekul protein atau enzim saling berdekatan menggumpal dan mengendap (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020).

Garam dapur adalah garam anorganik yang sebagian besar (lebih dari 80%) terdiri dari senyawa natrium klorida (NaCl), meskipun mengandung berbagai senyawa lain. Selain itu, seperti magnesium klorida ($MgCl_2$), magnesium sulfat ($MgSO_4$) dan kalsium klorida ($CaCl_2$). Garam Himalaya menjadi salah satu jenis garam yang cukup terkenal karena manfaat kesehatannya yang lebih baik dibandingkan dengan garam dapur (NaCl) yang sudah banyak dipasaran. Garam Himalaya ini memeliki warna pink atau hitam yang khas, meskipun yang warna hitam lebih jarang ditemukan. Garam Himalaya kaya akan mineral. Selain natrium dan klorin, terdapat juga kromium, besi dan seng. Oleh karena itu, Garam Himalaya tidak hanya berfungsi sebagai aksen penambah cita rasa dan estetika dalam berbagai kreasi kuliner, tetapi juga sering dipakai di beberapa rumah tangga sebagai resep tradisional untuk penyakit gastrointestinal dalam keadaan darurat (Chander et al., 2020).

Hasil penelitian Kumaunang (2011) menunjukkan bahwa temperatur dan pH optimal untuk ekstraksi enzim bromelain menggunakan ammonium sulfat 60% dalah 65°C, pH 5,0-6,5 dihasilkan ekstrak tertinggi sebesar 0,039%. Dewi (2020) menyatakan isolasi bromelain dengan garam dapur 40% menunjukkan hasil rendemen tertinggi sebesar 7,7768% pada pH 9. Keterbaharuan dari penelitian ini menggunakan keseluruhan nanas terdiri dari kulit, buah dan bonggol menjadi satu-kesatuan menggunakan pengendapan dengan garam himalaya (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020). Melakukan pendekatan desain Box-behnken sebagai metode optimasi karena mampu mengevaluasi pengaruh berbagai faktor terhadap respon yang diinginkan secara lebih efisien. merupakan metode desain permukaan respon yang banyak digunakan untuk menetapkan sebab akibat antara faktor dan respon dalam eksperimen. Dapat memberikan gambaran interaksi antar faktor sekaligus menentukan kondisi

optimum. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam menghasilkan rancangan eksperimen, efisien dan aplikatif di berbagai bidang industri.

Tujuan dari penelitian ini untuk menentukan kondisi optimal yang mempengaruhi penggunaan desain Box-behnken konsentrasi, pH, dan waktu perendaman. Optimalisasi ini diharapkan dapat menghasilkan kondisi terbaik yang mampu meningkatkan rendemen serta aktivitas enzim bromelain. Serta menganalisis aktivitas enzim menggunakan metode Murachi. Mengidentifikasi metode pengendapan enzim bromelain dengan menggunakan garam himalaya, serta menentukan bagaimana variasi kondisi tersebut mempengaruhi kinerja dan efektivitas enzim bromelain.

METODE

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas enzim bromelain buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) menggunakan metode Murachi. Desain Penelitian digunakan Metodelogi Permukaan Respon (*Response Surface Methodology-RSM*) untuk mengoptimalkan proses menggunakan aplikasi Design Expert 13 dengan metode Box-behnken. Penelitian ini dilakukan di laboratorium FMIPA Uniga pada bulan Juli-September 2025. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Nanas (*Ananas comosuss* L. Merr) diambil keseluruhan nanas (kulit, buah dan bonggol). Enzim bromelain merupakan sekelompok enzim proteolitik yang ditemukan secara alami di dalam tanaman nanas pada bagian kulit, buah dan bonggolnya dari keluarga *Bromeliaceae,* enzim ini memiliki kemampuan untuk memecah molekul protein yang kompleks melalui hidrolisis ikatan peptida, mengibahnya menjadi molekul molekul yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino (Merr *et al.*, 2022). Ekstraksi kasar buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dilakukan untuk mengisolasi metabolit sekunder sebagai bahan baku sediaan (Asworo & Widwiastuti, 2023). Sebanyak 500 mL filtrat nanas distabilkan menggunakan buffer pH 7 untuk menjaga aktivitas enzim bromelain yang optimal pada rentang pH 6–8, serta disimpan pada suhu 4°C guna mencegah denaturasi dan kontaminasi mikroba (Fissore et al., 2023). Selanjutnya, dilakukan optimasi pengendapan (*salting out*) menggunakan variasi konsentrasi garam Himalaya (30%, 40%, dan 50%). Penambahan garam ini memicu persaingan antara ion mineral dengan protein dalam mengikat molekul air, sehingga enzim kehilangan lapisan hidrasinya dan mengendap. Proses ini dilakukan dengan bantuan *magnetic stirrer* untuk memastikan kelarutan homogen, diikuti inkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C untuk memaksimalisasi pembentukan endapan enzim secara efisien (Gul et al., 2021).

Alat dan bahan

Alat

Corong kaca (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), gelas kimia (Pyrex®), pH meter (Ionix 100), blender (Philips), pisau, mikropipet (Transferpette®S), Timbangan Analitik (Ohause®), spektrofotometri (Genesys 10S®), Spektrofotometer (Shimadzu®), gelas ukur (Pyrex®), batang pengaduk, rak tabung, mikropipet (Dragonlab®), kertas saring (Whatman®), sentrifugasi (Beckman J2-HS®) dan Durometer Shore A.

Bahan

Buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dari Pasar Lokal, Garam Himalaya, Buffer fosfat pH 6, 7 dan 8 (Mitra lab), kasein, TCA 30% (Asam Trikloroasetat, MP Biomedicals), NaOH (Sigma-Aldrich), Danging sapi, HCl (Sigma-Aldrich), Tirosin (Sigma-Aldrich), H2SO4 (Sigma-Aldrich), substrat kasein 40 mg/mL (Himedia) dan aquadest (OneMed).

Langkah-langkah penelitian

Penyiapan Sampel

Bahan yang digunakan yaitu Buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) diambil keseluruhan nanas antara kulit, buah dan bonggolnya, diambil dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan partikel dari buah nanas.

Pembuatan Ekstrak Kasar Buah Nanas

Pembuatan ekstark kasar buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) mengacu pada penelitian Dewi (2020). Tahap awal dilakukan dengan memotong buah nanas dan ditimbang sebanyak 500 gr. Setelah itu, diblender, diperas, dan disaring untuk mendapatkan cairan jernih berupa ekstrak kasar bromelain. Ekstrak ini, kemudian diambil filtrat bening dan disimpan pada suhu 4℃. Cairan jernih nanas dimasukkan ke 3 gelas kimia sebanyak 50 mL, lalu ditambahkan dengan 50 mL buffer pH 7 pada masing-masing sampel. Sampel-sampel ini kemudian disimpan pada suhu 4℃ selama sehari (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020).

Pengendapan Ekstrak Kasar Bromelain

Filtrat ekstrak kasar bromelain ditambahkan garam Himalaya sebanyak 30 %, 40%, dan 50% sambil diaduk dengan pengaduk magnetic stirrer selama 45 menit. Campuran ini kemudian disimpan sehari suhu 4℃. Proses terakhir adalah pemisahan menggunakan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecapatan 4000 rpm (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020).

Rendemen Ekstrak Kasar Bromelain

Rendemen bromelain dihitung dengan membagi berat enzim yang diperoleh dengan berat buah nanas yang digunakan persamaan Dewi (2020).

Rendemen Enzim (%)=(Berat Enzim Bromelain)/(Berat Buah Nanas) x100%

Pembuatan Larutan Standar Tirosin

Ditimbang 0,050 gr tirosin lalu dilarutkan dengan 3,5 mL HCl 0,1N dalam labu ukur 50 mL kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas voleme 50 mL (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020).

Verifikasi Metode

Linearitas

Larutan baku standar tirosin dibuat dengan lima konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Untuk menghitung linearitas larutan ini, dilakukan perhitungan statistik koefisien kolerasi (R2) dengan memasukkan data konsentrasi dan nilai absorbansi dari larutan baku tersebut. Dengan konsentrasi kadar larutan baku untuk memperoleh regresi linier dengan meggunakan persamaan y=bx+a juga

nilai kolerasi (R2) adalah ukuran statistik yang menggambarkan seberapa baik hubungan antara variabel x dan y dapat dijelaskan oleh model linear tersebut (Pillai et al., 2024).

Presisi

Presisi mengacu pada sejauh mana hasil analisis individual konsisten jika prosedur diulang pada sampel ganda atau beberapa sampel yang homogen. Uji presisi dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan baku standar tirosin pada konsentrasi 40 ppm pada panjang gelombang maksimum dengan pengulangan 6 kali. Hasil presisi metode analisis dinyatakan sebagai simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV). Untuk data absorbansi dari linearitas, nilai rata-rata % recovery diitung terlebih dahulu, kemudian nilai RSD dihitung menggunakan rumus berikut:

% RSD = SD/($\bar{x}$) x 100%

Nilai presisi yang memenuhi syarat yaitu RSD < 2% (Pillai et al., 2024).

Akurasi

Akurasi merujuk pada tingkat ketepatan metode analisis yaitu seberapa dekat nilai yang diukur dari hasil diterima, yang bisa berupa hasil konvensional, hasil sebenarnya, atau hasil rujukan. Pengujian ini dilakukan menggunakan larutan baku standar tirosin dengan konsentrasi 32 ppm, 40 ppm, dan 48 ppm yang absorbansinya diukur terlebih dahulu pada panjang gelombang maksimum dengan pengulangan 3 kali. Persamaan berikut:

% recovery = "konsentrasi yang diperoleh" /"konsentrasi sesungguhnya" " x 100%"

Hasil perolehan kembali yang ideal yaitu 98-102% (Suhendi, Rohman and Cahyaningrum, 2023).

LoD dan LoQ

Penentuan batas deteksi bertujuan untuk mengetahui jumlah terkecil analit yang masih bisa dideteksi, meskipun tidak harus diukur, sedangkan penentuan batas kuantifikasi bertujuan untuk mengetahui jumlah terkecil analit yang dapat diukur dengan akurat. Perhitungan rumus sebagai berikut:

SD = √(" Σ (y-yi)²")/"n - 2"

LoD = "3 x SD" /"slope"

LoQ = "10 x SD" /"slope"

Uji Aktivitas Enzim Bromelain

Aktivitas bromelain dianalisis menggunakan metode Murachi dengan substrat kasein. Substrat kasein 40 mg/mL dicampurkan dengan enzim sebanyak 0,4 mg/mL dalam larutan buffer fosfat dengan pH 7, Campuran ini disimpan pada suhu 37℃ selama 15 menit (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020). Setelah disimpan, ke dalam campuran reaksi ditambahkan 2 mL larutan asam trikloroasetat (TCA) 30%. Protein yang terkoagulasi kemudian dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 274 nm. Sebagai kontrol, digunakan enzim komersial. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar tirosin, sehingga diperoleh nilai x adalah nilai aktivitas enzim dari sampel yang dapat ditentukan (Pillai et al., 2024).

Unit Aktivitas = "tirosin x V x 1" /"p x q "

Keterangan:

Tirosin = konsentrasi tirosin yang dihasilkan (μmol/mL)

V = volume total sampel pada setiap tabung (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

P = jumlah enzim yang digunakan (mL)

Design Expert 13 (Box-Behnken)

Design Expert 13 pada bagian Box-Behnken merupakan metode yang efisien untuk mengoptimalkan sistem dalam waktu singkat. Desain Box-Behnken (BBD) digunakan untuk mengoptimalkan proses pengempukkan daging, pada keunggulannya dalam mengevaluasi efek utama, interaksi dan hubungan kuadratik antar faktor dengan jumlah percobaan yang relative efisien dibandingkan desain faktorial penuh. Pada Faktor 1 (Konsentrasi), Faktor 2 (pH), Faktor 3 (Waktu perendaman) Dengan Respon yang diinginkan yaitu Response 1 (Rendemen), Response 2 (Uji keempukan). Sampel yang digunakan adalah daging sapi bagian paha belakang, dipilih karena memiliki tekstur relative alot sehingga sesuai sebagai model untuk tenderisasi. Daging dipotong berbentuk kubus ukuran ±2 cm, kemudian ditimbang dan diukur nilai keempukannya sebagai data awal sebelum perlakuan (Akram and Garud, 2021). Preparasi larutan perendaman dilakukan dengan melarutkan enzim bromelain sebanyak 0,05 gr ke dalam 40 mL buffer fosfat dengan variasi pH 6, 7 dan 8. Potongan daging kemudian direndam pada larutan tersebut dengan lama perendaman 15, 25 dan 35 menit sesuai dengan kombinasi perlakuan. Setelah perendaman, sampel diangkat, ditiriskan, ditimbang kembali, dan dilakukan pengukuran nilai keempukan daging menggunakan durometer (Cocîrlea et al., 2024).

Mengukur Tingkat Keempukan Daging

Pengujian keempukan dilakukan dengan menggunakan alat Durometer Shore A pada daging sapi bagian paha belakang, karena seratnya seragam, teksturnya alot. Potongan daging sapi dibuat seragam (±30 gr dengan ukuran 2x2x2 cm) agar hasil pengujian lebih konsisten. Daging yang sudah dipotong direndam terlebih dahulu dengan buffer pH 6, 7, 8 yang sudah ditambahkan enzim bromelain 40 mg, dengan waktu perendaman 15, 25, dan 35 menit disimpan pada suhu 4℃. Selanjutnya dipastikan durometer ditekan dengan merata pada permukaan daging, supaya hasil pengukuran tetap akurat. Untuk memastikan hasil yang akurat dilakukan pengukuran berkali-kali pada daging sapi yang sama dan menggunakan rata-rata nilai yang diperoleh (Ketnawa and Rawdkuen, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 Hasil Rendemen Enzim Bromelain

No.	Konsentrasi Garam Himalaya	Hasil Rendemen
1	30%	0,098%
2	40%	0,152%
3	50%	0,240%

Pada tabel 1, terlihat dari hasil data di atas rendemen yang paling tinggi pada konsentrasi garam Himalaya 50%. Hal ini menandakan bahwa proses pengendapan menggunakan garam konsentrasi yang lebih tinggi akan mampu mengendapkan protein. hal ini terkait dengan sifat kelarutan (Enzim Bromelain) pada larutan garam. Ada kalanya protein larut di air, tetapi tidak larut pada larutan garam, sebaliknya ada protein yang larut pada asam/basa, tetapi tidak larut pada air. Karena garam lebih kuat dalam menarik air, sehingga jumlah air yang tersedia untuk melarutkan protein berkurang. Kekurangan air inilah yang menyebabkan molekul protein saling menempel dan menggumpal, lalu mengendap. Karena enzim bromelain adalah senyawa protein yang akan mudah diisolasi melalui penambahan garam himalaya. Hal ini sesuai dengan peneliti Warlinda eka (2023) enzim bromelain akan mengendap dengan sempurna jika ditambahkan pelarut organik dan penggaruh variasi bahan pengendap enzim bromelain akan mengendap pada konsentrasi garam 20-60% (Triastuti *et al.*, 2023).

Uji lenearitas bertujuan untuk memastikan apakah hubungan antara variabel bersifat linear atau tidak dengan syarat nilai koefisien relasi mendekati 1 ($R^2 = 1$). dilakukan dengan menggunakan 5 konsentrasi larutan baku standar tirosin berbeda yaitu 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm dengan hasil yang didapat y=0,0121x – 0,0126 dengan hasil kolerasi R^2 = 0,9988. Nilai R^2 memenuhi syarat jika mendekati angka 1, semakin besar nilai korelasi mendekati angka 1 maka hubungan antara kedua variabel tersebut semakin erat dan hal ini menunjukkan bahwa hasil yang didapat sudah sesuai dengan hukum Lambert-Beer (Merr *et al.*, 2022). bahwa ekstraski enzim bromelain dengan garam Himalaya 40% memenuhi unsur presisi 0,57% dan memenuhi unsur akurasi 99,70% sesuai pendapat (Rosmania dan Yanti, 2020).

Metode Murachi diterapkan untuk mengukur aktivitas proteolitik bromelain melalui hidrolisis kasein menjadi peptida dan asam amino, di mana penambahan TCA 30% berfungsi menghentikan reaksi sekaligus mengendapkan protein sisa melalui denaturasi asam (Merr et al., 2022). Validitas metode ini dibuktikan dengan nilai Limit of Detection (LoD) sebesar 0,0148 ppm dan Limit of Quantitation (LoQ) sebesar 0,0493 ppm, yang menunjukkan sensitivitas serta kemampuan instrumen untuk mengukur analit secara akurat pada konsentrasi rendah (Guo et al., 2020).

Pengukuran spektrofotometri menunjukkan bahwa konsentrasi garam Himalaya 30% dan 40% menghasilkan panjang gelombang 274 nm dengan absorbansi tertinggi pada 40% (0,407), sementara konsentrasi 50% mengalami pergeseran ke 272 nm dengan penurunan absorbansi signifikan (0,084) akibat efek *salting out* dan denaturasi enzim (Novitasari and Thorifah, 2023).

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Enzim Bromelain

Sampel	λ (nm)	Absorbansi (OD)	Aktivitas Enzim U/mL
Enzim Bromelain Garam Himalaya 30%	274	0,210	0,0269
Enzim Bromelain Garam Himalaya 40%	274	0,407	0,0509
Enzim Bromelain Garam Himalaya 50%	272	0,084	0,0117
Enzim Bromelain Komersial	278	0,185	0,0240

Berdasarkan tabel 3, hasil penelitian nilai aktivitas enzim bromelain yang paling tinggi pada enzim bromelain garam himalaya 40% dengan nilai 0,0509 U/mL, Sesuai dengan peneliti Nurhayati dewi (2020) menggunakan garam dapur 40% dengan nilai hasil aktivitas tertinggi (Dewi, Sundara and Fusvita, 2020). Peningkatan konsentrasi dari 30% ke 40% meningkatkan absorbansi secara signifikan dari (0,210 menjadi 0,407), yang berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas enzim. Ini menunjukkan bahwa 40% adalah konsentrasi garam yang paling efektif untuk memisahkan dan mengendapkan enzim bromelain Dan nilai aktivitas enzim paling rendah enzim bromelain garam himalaya 50%. Hal ini terjadi karena denaturasi konsentrasi garam yang lebih tinggi menyebabkan molekul air tertarik ke ion-ion garam, sehingga air tidak lagi dapat menjaga struktur enzim, enzim kehilangan fungsinya. Karena enzim sedikit aktifnya, jumlah produk yang dihasilkan tirosin akan sedikit, akibatnya nilai absorban dan panjang gelombang dapat mempengaruhi nilai aktivitas enzim bromelain.

Pada penelitian ini menggunakan Desain Box-Behnken, merupakan *software design expert 13* metode desain permukaan respons yang banyak digunakan, terutama berguna untuk menetapkan hubungan sebab-akibat antara faktor dan respons untuk mencapai kondisi yang optimal. Di mana desain box-behnken ini faktor berada pada tingkat tertinggi, tengah dan terendah. Faktor 1 Konsentrasi (30%, 40%, dan 50%), faktor 2 pH (6, 7, dan 8) dan faktor 3 Waktu perendaman (15 menit, 25 menit dan 35 menit), ketiga faktor ini dipilih karena berpengaruh terhadap efektivitas kerja enzim bromelain dalam mengempukkan daging. Dengan respons 1 (Rendemen) adalah hasil persentase berat daging sebelum dan setelah perlakuan. Menunjukkan nilai berkisar 39,21%-52,38%. Sedangkan pada respons 2 (uji keempukan) menggunakan durometer untuk mengukur keempukan/tekstur pada daging. Pada penelitian ini nilai semakin kecil berarti daging semakin empuk. Rentang nilainya 0-1 semakin dekat pada nilai 0 berarti lebih empuk (Szpisják-Gulyás *et al.*, 2023).

Tabel 3. Hasil Desain Box-Behnken

No.	Faktor 1 Konsentrasi (%)	Faktor 2 pH	Faktor 3 Perendaman (Menit)	Respons 1 Rendemen (%)	Respons 2 Uji keempukan (Shore)
1	30	6	25	50	0,5
2	50	6	25	46,51	0,5
3	30	8	25	43,18	0
4	40	8	15	40	1
5	50	7	35	51,16	0
6	50	8	25	52,17	1
7	40	8	35	52,38	0
8	40	6	15	44	0,5
9	40	7	25	41,18	0
10	30	7	15	50	0,5
11	30	7	35	48,07	0
12	50	7	15	48	1
13	40	6	35	41,67	0,5
14	40	7	25	39,21	0
15	40	7	25	40,82	0,5

Berdasarkan hasil optimasi dihasilkan 15 formula setiap respon dianalisis menggunakan model ANOVA (*Analysis of variance*) yang dapat digunakan untuk melihat signifikan respon antar variabel.

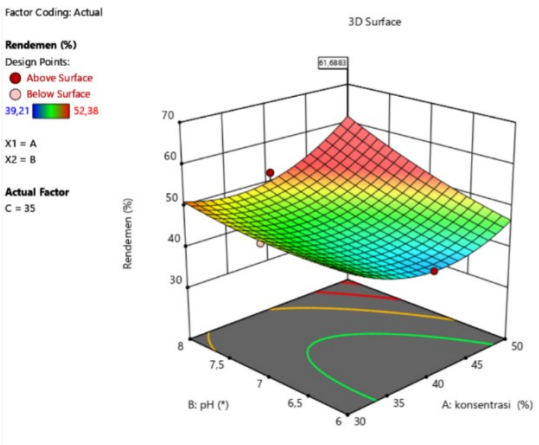
Tabel 4. Hasil Analisis ANOVA untuk Respon Rendemen dan Keempukan

Respon	Sumber Variasi	*p-value*	Keterangan
Rendemen	Model	0,0213	Signifikan
Rendemen	Lack of Fit	0,1456	Tidak signifikan
Keempukan	Model	0,0264	Signifikan
Keempukan	Lack of Fit	0,7256	Tidak signifikan

Hasil ANOVA respon rendemen Pada bagian model nilai *p-value* adalah 0,0213 dengan hasil signifikan, bahwa nilai tersebut signifikan secara statistik mampu menjelaskan hasil variasi respon rendemen dengan baik dan ada interaksi yang nyata antara faktor-faktor yang diuji dengan hasil rendemen. Interaksi antara faktor A (konsentrasi) dan B (pH), interkasi antara faktor B (pH) dan C (waktu perendaman) dan pengaruh faktor A (konsentrasi) secara kuadratis (A^2) sangat siginifikan. Interaksi inilah yang dapat memiliki pengaruh yang siginifikan terhadap rendemen. Pada bagian *Lack of fit* dengan hasil 0,1456 tidak signifikan adalah hasil yang baik menunjukkan bahwa model kuadratik yang dipilih sudah sesuai dengan data eksperimen model ini dapat memprediksi respon dengan akurasi yang baik. Hasil nilai R^2 0,9284 atau 92,84%, nilai R2 prediksi -0,0475 negatif menunjukkan bahwa rata-rata keseluruhan merupakan prediktor respon yang lebih baik dari pada model. Dalam beberapa kasus, model orde yang lebih tinggi juga dapat memprediksi respon yang lebih baik (Akram and Garud, 2021).

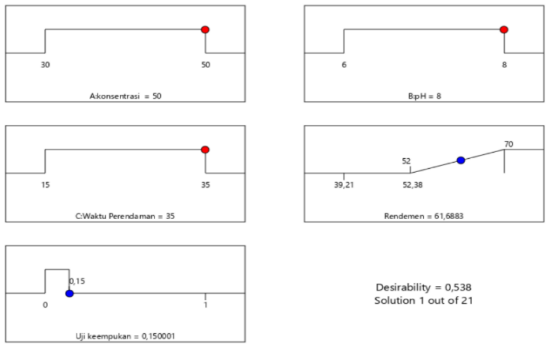
Hasil respon uji keempukan Model nilai *p-value* adalah 0,0264 signifikan menunjukkan bahwa interaksi antar faktor memiliki pengaruh signifikan terhadap respon uji keempukan. Hasil *Lack of fit* adalah 0,7265 tidak signifikan berarti menunjukkan tidak terdapat perbedaan. Dengan hasil R^2 0,7738 atau 77,38% menunjukkan bahwa angka ini cukup baik model ini mampu menjelaskan sekitar 77,38%

variasi yang terjadi pada data uji keempukan. R^2 yang diprediksi 0,4519 cukup sesuai dengan R^2 yang disesuaikan 0,6042. (0,6042–0,4519= 0,1523), artinya selisih kurang dari 0,2. Hasil *adeq precision* mengukur seberapa baik model dapat memprediksi respon yang diinginkan dibandingkan dengan kesalahan atau variasi yang tidak dapat dijelaskan (derau). Dengan hasil 7,134 menunjukkan sinyal yang memadai untuk memprediksi respon dan model ini dapat digunakan (Akram and Garud, 2021).



Gambar 1. Response Surface Plot Pengaruh Konsentrasi Garam Himalaya dan pH Terhadap Rendemen Bromelain

Berdasarkan analisis, suatu formula dapat dikatakan optimum jika menghasilkan nilai *Desirability* maksimum. *Desirability* adalah nilai yang menunjukkan seberapa baik sebuah formula memenuhi kriteria yang telah ditetapkan. Nilai *Desirability* terbaik mendekati 1. Hasil penelitian dari 15 formula menunjukkan nilai *Desirability* 0,538, nilai ini sangat baik karena mendekati 1, menandakan bahwa rancangan dihasilkan sangat sesuai dengan kriteria yang diinginkan. Nilai *Desirability* ini berkisar 0-1. Semakin mendekati 1, maka semakin baik formula yang dihasilkan, melainkan untuk menemukan formula terbaik yang paling sesuai dengan fungsi dan tujuannya (Ramadhani *et al.*, 2017). Setelah diperoleh nilai *Desirability* yang terbaik maka dapat diperoleh formula yang paling optimum, dihasilkan formula terbaik dengan konsentrasi 50%, pH 8, dan waktu perendaman 35 menit setelah memperoleh formula terbaik menghasilkan *point prediction* digunakan untuk memprediksi respon dari suatu eksperimen berdasarkan model yang telah dibuat. Menunjukkan hasil prediksi untuk dua variabel respon bahwa untuk rendemen memiliki prediksi yang lebih presisi dan dapat diandalkan, karena interval kepercayaan (Cl) relatif sempit dan sesuai (Verma *et al.*, 2019).



Gambar 2. Formula terbaik, *point prediction* dan *desirability*



Gambar 3. Proses dan hasil pengempukkan daging

Tabel 2. Hasil evaluasi formula terbaik

Sampel	Sebelum direbus		Sesudah direbus		
	Berat daging (gr)	Durometer (Shore HA)	Berat daging (gr)	Durometer (Shore HA)	Rendemen (%)
1	2,6	003	1,0	000	61,53 %
2	2,6	004	1,2	000	53,84 %
3	2,7	003,5	1,3	000	51,85 %
4	2,6	003,5	1,1	000	57,69 %
5	2,3	003	1,1	000	56,52 %
6	2,4	003	1,2	000	50 %
		Rata-rata			55,24%
		SD			4,20

Berdasarkan hasil verifikasi formula terbaik pada konsentrasi 50%, pH 8, dan waktu perendaman 35 menit, Kedua respon yang digunakan dalam optimasi tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan anatara nilai observasi dan prediksi dari *design expert 13* Box-behnken. Nilai rat-rata dari pengujian yang dilakukan secara dibuat 6 sampel berada dalam rentang 95% PI *low* dan 95% PI *high*, seperti yang ditunjukkan pada. *Prediction Interval* (PI) adalah rentang yang memprediksi hasil pengukuran pada kondisi yang sama, ketika hasil aktual berada dalam rentang PI yang diprediksi, maka menunjukkan bahwa model yang digunakan valid dan dapat diaplikasikan. Semakin baik kecocokan antara hasil observasi dan prediksi, semakin akurat pula model yang ada (Fauzi *et al.*, 2022).

Dalam penelitian mengukur tingkat keempukan daging untuk menguji keempukan pada daging yang dilakukan untuk mengevaluasi hasil dari formula terbaik yang disarankan oleh *Design expret 13* Box-behnken pengujian ini didasarkan pada kemampuan enzim bromelain yang merupakan salah satu jenis protease, yang dapat memecah protein otot pada jaringan ikat dengan cara menghidrolisis ikatan peptida dan menjadi asam amino, proses ini secara efektif mengurangi kekerasan pada daging (Abdel-naeem and Mohamed, 2016) dengan hasil yang terdapat mengalami penurunan tingkat kekerasan pada daging menjadi empuk. Penurunan ini, bahwa enzim bromelain dapat meningkatkan keempukan daging melalui degradasi protein jaringan ikat serta miofibril (Arshad *et al.*, 2017).

SIMPULAN

Enzim Bromelain dari buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dengan menghasilkan aktivitas enzim yang paling tinggi pada konsentrasi garam himalaya 40% Unit aktivitasnya 0,0269 U/mL. Metode yang digunakan penggunaan desain box behnken untuk optimasi pengempukkan daging proses uji aktivitas bromelain mendapatkan formula terbaik pada garam himalaya 50%, pH 8, dan waktu perendaman 35 menit menghasilkan rendemen 61,68% dan uji keempukan 0 shore menyatakan bahwa karena kemampuannya memecah protein, menghidrolisis ikatan protein pada serat otot daging dan jaringan ikat, mengubahnya menjadi molekul yang lebih kecil dan lunak memberikan durasi waktu yang optimal bagi garam dan enzim untuk bekerja, sehingga menghasilkan tekstur daging yang lebih empuk. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa enzim bromelain dari buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) sangat efektif untuk mengempukkan daging.

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-naeem, H.H.S. and Mohamed, H.M.H. (2016) 'Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain', 118, pp. 52–60.

Akram, W. and Garud, N. (2021) 'Design expert as a statistical tool for optimization of 5-ASA-loaded biopolymer- based nanoparticles using Box Behnken factorial design'.

Arshad, M.S. *et al.* (2017) 'Plant and bacterial proteases : A key towards improving meat tenderization , a mini review Plant and bacterial proteases : A key towards improving meat tenderization , a mini review', *Cogent Food & Agriculture*, 118(1).

Asworo, R.Y. and Widwiastuti, H. (2023) 'Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia dan Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Sirsak', 3(2), pp. 256–263.

Chander, V. et al. (2020) 'Structural characterization of Himalayan black rock salt by SEM, XRD and in-vitro antioxidant activity', *Science of the Total Environment*, 748.

Cocîrlea, M.D. *et al.* (2024) 'Box–Behnken Design-Based Optimization of Extraction Parameters of Phenolics, Antioxidant Activity, and In Vitro Bioactive and Cytotoxic Properties of Rhus typhina Fruits', *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(23).

Dewi, N., Sundara, Y.M. and Fusvita, M. (2020) 'Isolasi Bromelin Dari Buah Nanas (Ananas comosus L. Merr) Dengan Garam Dapur', *Jurnal Riset Kesehatan*, 12(2), pp. 348–355.

Fauzi, R.A. *et al.* (2022) 'Optimasi Proses Pengeringan Terhadap Aktivitas Antioksidan Bunga Telang (Clitoria ternatea) Menggunakan Metode Respon Permukaan Optimization of Drying Process on Antioxidant Activity of Butterfly Pea (Clitoria ternatea) by Using Response Surface Metho', 23(1).

Fissore, A. *et al.* (2023) 'Extraction and Characterization of Bromelain from Pineapple Core : A Strategy for Pineapple Waste Valorization', pp. 1–10.

Gul, A. *et al.* (2021) 'Extraction, Partial Purification and Characterization of Bromelain from Pineapple (Ananas Comosus) Crown, Core and Peel Waste', *Brazilian Archives of Biology and Technology*,

64(pH 7), pp. 1–10.
Guo, N. *et al.* (2020) 'Continuous Fluorometric Method for Determining the Monophenolase Activity of Tyrosinase on L-Tyrosine, through Quenching L-DOPA Fluorescence by Borate', *Analytical Chemistry*, 92(8), pp. 5780–5786.
Irianti, T. *et al.* (2016) 'Comparation Of Several Plants Extract And Vitamin C Inhibition Activity To Tyrosine Photodegradation Induced By Ketoprofen And Its Total Phenolic Compounds Perbandingan Inhibisi Berbagai Ekstrak Tumbuhan Dan Vitamin C Pada Fotodegradasi Tirosin Yang Diind', *Traditional Medicine Journal*, 21(3), p. 2016.
Ketnawa, S. and Rawdkuen, S. (2011) 'Application of Bromelain Extract for Muscle Foods Tenderization', *Food and Nutrition Sciences*, 02(05), pp. 393–401.
Kumaunang, M. and Kamu, V. (2011) 'Aktivitas Enzim Bromelin Dari Ekstrak Kulit Nenas (Anenas comosus)', *Jurnal Ilmiah Sains*, 15(1), p. 198.
Merr, A.C.L. *et al.* (2022) 'Isolasi Dan Karakterisasi Serbuk Enzim Bromelin Dari Batang Nanas (Ananas Comosus (L .) Merr). Isolation And Characterization Of Bromelin Enzyme Powder From Pineapple Stem', 7(4), pp. 751–758.
Novitasari, A.E. and Thorifah, E. (2023) 'Aktivitas Enzim Bromelin Dalam Urin Wanita Usia Produktif Yang Mengkonsumsi Buah Nanas Dengan Metode Spektrofotometri', *Termometer: Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan dan Kedokteran*, 1(1), pp. 87–95.
Pillai, K. *et al.* (2024) 'Development and Validation of Micro-Azocasein Assay for Quantifying Bromelain', pp. 1–11.
Prasetyo, H.I., Wijana, G. And Pradnyawathi, N.L.M. (2023) 'Identifikasi dan Karakterisasi Tanaman Nanas (Ananas comosus (L.) Merr) di Daerah Bali dalam Upaya Pengembangannya', *Agrotrop : Journal on Agriculture Science*, 13(1), p. 113.
Ramadhani, R.A. *et al.* (2017) 'Review Pemanfaatan Design Expert untuk Optimasi Komposisi Campuran Minyak Nabati sebagai Bahan Baku Sintesis Biodiesel', *Jurnal* Teknik Kimia *dan Lingkungan*, 1(1), pp. 11–16.
Rosmania and Yanti, F. (2020) 'Jurnal Penelitian Sains', *Jurnal Penelitian Sains*, 21(3), pp. 163–167.
Suhendi, A., Rohman, A. and Cahyaningrum, S. (2023) 'Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Protein Ekstrak Ikan Gabus dengan Metode Lowry dan Bromocresol Green Validation of Method Analysis on Determination Protein Level Snakehead Fish Extract by Lowry and Bromocresol Green Method', *Jurnal Kefarmasian Indonesia,* 13(1), pp. 50–58.
Szpisják-Gulyás, N. *et al.* (2023) 'Methods for experimental design, central composite design and the Box–Behnken design, to optimise operational parameters: A review', *Acta Alimentaria*, 52(4), pp. 521–537.
Triastuti, W.E. *et al.* (2023) 'Pengaruh Variasi Bahan Pengendap pada Proses Purifikasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas (Ananas comosus L.)', *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia 'Kejuangan'*, 4(1), pp. 1–5.
Verma, A. *et al.* (2019) 'Systematic optimization of cationic surface engineered mucoadhesive vesicles employing Design of Experiment (DoE): A preclinical investigation', *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, pp. 1142–1155.