

KARAKTERISASI ENZIM BROMELIN YANG DIAMOBILISASI DALAM AGAR KOMERSIAL

Rita Oktavia¹, Suharti¹, Evi Susanti¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Malang

e-mail: oktaviarita90@gmail.com, s.suharti@gmail.com,
esusanti.kim@gmail.com

Abstrak: Penggunaan ekstrak kasar enzim bromelin untuk aplikasi di bidang industri kurang menguntungkan karena enzim akan mudah terdenaturasi. Untuk mengatasi masalah tersebut dilakukan pemurnian dan amobilisasi enzim. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui: (1) aktivitas enzim bromelin hasil pemurnian parsial dengan metode presipitasi etanol sebelum dan sesudah diamobilisasi dalam agar komersial, dan (2) perubahan aktivitas enzim bromelin amobil pada pemakaian berulang. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim bromelin yang dimurnikan menggunakan etanol 80% dengan perbandingan 1:4 mengalami penurunan sebesar 37,30% setelah diamobilisasi dengan 2% agar komersial. Enzim bromelin amobil dapat digunakan sebanyak 3 kali dengan sisa aktivitas sebesar $\pm 16,84\%$ pada pemakaian ketiga. Aktivitas enzim bromelin amobil pada pemakaian pertama, kedua, dan ketiga berturut-turut sebesar 15,584 Unit/mL, 11,264 Unit/mL, 2,624 Unit/mL.

Kata kunci : amobilisasi, bromelin, agar

Abstract: The use of crude extract of bromelain for industrial applications is less profitable because it will be easily denature. To overcome this problem, crude extract needs to be purified and immobilized. The purposes of this study were to determine: (1) the activity of bromelain that had been purified by ethanol precipitation before and after immobilization in 2% commercial agar, (2) the activity reduction of immobilized bromelain after reusing. The result showed that bromelain activity which has been purified using 80% ethanol with ratio 1:4 decreased about 37,30% after immobilization in 2% commercial agar. Immobilized bromelain can be reused for 3 times with the remaining activity of $\pm 16,84\%$ after third usage. The activity of immobilized bromelain on first usage, second usage, and third usage is 15,584 Unit/mL, 11,264 Unit/mL, 2,624 Unit/mL, respectively.

Keywords: immobilization, bromelain. agar

PENDAHULUAN

Bromelin merupakan campuran protease yang diisolasi dari tanaman nanas, dengan nama latin *Ananas comosus* (Linn.) (Gautam, 2010: 68). Jenis protease dalam bromelin adalah protease sulfhidril (Tochi, 2008: 513). Bromelin dimanfaatkan untuk pengempukan daging, obat gangguan pencernaan (contohnya Benozym dan Elsazym) (ISFI, 2007: 366), dan anti inflamasi (Secor Jr. *dkk.*, 2005: 68). Enzim ini juga digunakan untuk aplikasi industri pada pelarutan protein

gandum, penstabilan bir, produksi hidrolisat protein, dan penyamakan kulit (Ketnawa *dkk.*, 2009: 458).

Aktivitas bromelin dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu bagian tanaman nanas sebagai sumber enzim, jenis substrat, inhibitor, dan jenis presipitan yang digunakan untuk pemurnian bromelin (Esih, 2006). Enzim bromelin yang diisolasi dari daging buah nanas matang memiliki aktivitas lebih tinggi daripada enzim bromelin yang diisolasi dari daun dan buah nanas mentah. Kondisi optimum reaksi enzimatik bromelin dari daging buah nanas matang dicapai pada pH 6,5 pada temperatur 50⁰ C selama 20 menit, (Priya *dkk.*, 2012: 12-13). Menurut Tochi (2008: 513) aktivitas bromelin stabil pada rentang pH 2 sampai 9. Keberadaan Fe³⁺ dan Cu²⁺ dapat menurunkan aktivitas bromelin secara drastis (Liang *dkk.*, 2012: 19). Oleh karena itu, adanya kelator ion logam seperti Na₂-EDTA dengan jumlah yang tepat dapat meningkatkan aktivitas bromelin (Li-Chao *dkk.*, 2011: 225).

Ekstrak kasar enzim bromelin berupa campuran protein yang sangat encer. Akibatnya, bromelin dalam ekstrak kasar enzim ini mudah terdenaturasi sehingga kurang menguntungkan jika diaplikasikan sebagai enzim industri. Untuk mengatasi masalah tersebut umumnya dilakukan pemurnian dan amobilisasi enzim.

Amobilisasi enzim merupakan suatu teknik penjebakan enzim dalam matriks polimer atau pengikatan enzim pada suatu material pembawa (Tischer & Wedekind, 1999: 96), namun tetap mempertahankan sifat katalitiknya (Twyman, 2005: 523). Enzim amobil memiliki beberapa keuntungan dibandingkan enzim murni tanpa diamobilisasi, yaitu lebih mudah dipindahkan dari campuran reaksi (Twyman, 2005: 523), dapat digunakan berulang-ulang, dan langsung menghasilkan produk yang bebas enzim (Tischer & Wedekind, 1999: 97).

Amobilisasi enzim bromelin telah dilakukan dengan matriks pengamobil kitosan (Amalia & Nawfa, 2010) dan kappa karageenan (Sebayang, 2006: 20). Kelemahan teknik amobilisasi tersebut yaitu matriks pengamobil tersebut harganya relatif mahal. Hal ini mengakibatkan penggunaan bromelin amobil di industri masih terbatas. Oleh karena itu, perlu diupayakan pencarian matriks yang

lebih murah yang dapat digunakan untuk mengamobilisasi enzim bromelin. Alternatif yang dapat digunakan adalah agar komersial.

Agar komersial adalah agar yang biasa digunakan untuk membuat puding atau jeli. Secara kimia, agar merupakan serangkaian kompleks polisakarida yang dibangun oleh agarosa dan agaropektin. Persentase agarosa dalam agar adalah sekitar 84%-95%, sedangkan agaropektin adalah sekitar 5%-16%, tergantung jenis rumput lautnya (Salamah *dkk.*, 2005: 14). Agen pembentuk gel pada agar adalah agarosa. Agarosa dapat digunakan sebagai matriks pengamobil karena dapat membentuk gel dengan ukuran pori-pori tertentu (Xiong *dkk.*, 2005: 5642), stabil dalam asam dan tidak berinteraksi dengan protein (Prakash & Jaiswal, 2011: 572).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui: (1) aktivitas enzim bromelin hasil pemurnian parsial dengan metode presipitasi etanol sebelum dan sesudah diamobilisasi dalam agar komersial, dan (2) perubahan aktivitas enzim bromelin amobil pada pemakaian berulang.

METODE

Isolasi dan Pemurnian Enzim Bromelin

Sebanyak \pm 50 gram potongan daging buah nanas matang diblender bersama buffer fosfat (mengandung 5 mM EDTA) dingin pH 7 selama 30 menit. Sari buah nanas yang dihasilkan disaring menggunakan kain katun dan diperas. Filtrat disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada temperatur 4⁰ C sehingga dihasilkan supernatan (ekstrak kasar bromelin). Ekstrak kasar enzim diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Pemurnian enzim bromelin dilakukan menurut Sebayang (2006) yang dimodifikasi. Ekstrak kasar enzim dipresipitasi menggunakan etanol 80% dengan perbandingan ekstrak kasar : etanol adalah 1:4 dan didiamkan semalam pada temperatur \pm 6⁰ C. Campuran disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada temperatur 4⁰ C. Pelet kemudian dilarutkan buffer fosfat pH 7. Larutan enzim diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Amobilisasi Enzim Bromelin

Larutan agar dengan konsentrasi 2% (b/b) disiapkan dengan cara 0,2 gram agar serbuk dilarutkan dalam 9,26 mL buffer fosfat pH 6,5 (volume total gel agar = 10 gram, ρ buffer fosfat pH 6,5 = 1,058 g/mL) dan dipanaskan hingga mendidih

Setelah temperatur turun menjadi 45⁰ C, sebanyak 1,2 mL enzim hasil pemurnian dicampurkan dengan larutan agar. Gelas Beaker yang berisi agar dan enzim segera dimasukkan ke penangas es. Setelah mengeras agar yang berisi enzim bromelin dipotong ukuran 1 x 1 cm dan dibilas dengan akuades untuk menghilangkan enzim yang tidak teramobil. Enzim bromelin amobil kemudian ditambah 50 mM buffer fosfat pH 6,5 dan diuji aktivitasnya. Air cucian enzim bromelin amobil diuji kadar proteinnya.

Persen amobilisasi enzim bromelin dalam penelitian ini dihitung seperti Persamaan 1.

$$\%Amobilisasi = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad \text{Persamaan 1}$$

keterangan:

A = konsentrasi enzim yang ditambahkan dalam matriks pengamobil

B = konsentrasi enzim dalam air hasil cucian enzim amobil

Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein didasarkan pada metode *Lowry* yang dimodifikasi dimana pengukuran absorbansi larutan dilakukan pada panjang gelombang 590 nm. Kadar protein dapat diketahui melalui *fitting* data absorbansi menggunakan persamaan regresi kurva standar BSA.

Pengujian Aktivitas Proteolitik Enzim Bromelin

Pengujian Aktivitas Proteolitik Enzim Bromelin Bebas

Pengujian aktivitas proteolitik enzim bromelin dilakukan menurut Sebayang (2006) dengan modifikasi. Sebanyak 1 mL kasein 0,65% direaksikan dengan 0,5 mL ekstrak kasar enzim bromelin dalam 4 mL buffer fosfat pH 6,5. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur 50⁰ C selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi enzimatik, ke dalam larutan enzim ditambahkan 3 mL larutan TCA 20%. Campuran tersebut didinginkan dalam penangas es selama 30

menit. Protein yang terkoagulasi dipisahkan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4.000 rpm. Aktivitas enzim diketahui menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* pada panjang gelombang 650 nm. Aktivitas bromelin didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan asam amino dan peptida terlarut yang sebanding dengan 1 µg/mL tirosin per menit dibawah kondisi percobaan. Untuk menentukan konsentrasi tirosin yang dibebaskan, absorbansi yang diperoleh dari uji aktivitas enzim diekstrapolasi pada persamaan garis regresi kurva standar tirosin. Sebagai kontrol adalah larutan enzim yang telah dimatikan aktivitasnya menggunakan larutan TCA 20%.

Pengujian Aktivitas Proteolitik Enzim Bromelin Amobil

Enzim bromelin amobil dimasukkan ke dalam tabung reaksi diameter 2,5 cm dan ditambah 10 mL buffer fosfat pH 6,5 dan 1 mL kasein 0,65%. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur 50⁰ C selama 20 menit. Enzim amobil dan larutannya dipisahkan secara dekantasi. Cairan hasil dekantasi lalu ditambah 5 mL TCA 20% dan dimasukkan dalam penangas es selama 30 menit. Protein yang terkoagulasi dipisahkan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4.000 rpm. Aktivitas enzim diketahui menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* pada panjang gelombang 650 nm. Pengujian aktivitas enzim bromelin amobil juga dilakukan tanpa substrat untuk mengetahui apakah enzim yang teramobil terlepas dari dalam agar. Sebagai kontrol adalah larutan enzim yang telah dimatikan aktivitasnya menggunakan larutan TCA 20%.

Pengujian Aktivitas Bromelin Amobil pada Pemakaian Berulang

Untuk mengetahui sampai pemakaian berapa kali enzim bromelin amobil masih memiliki aktivitas maka dilakukan pengujian aktivitas bromelin amobil pada pemakaian berulang. Dengan mengasumsikan aktivitas enzim bromelin amobil hasil pengujian aktivitas yang pertama adalah 100%, enzim bromelin diuji aktivitasnya kembali sehingga diperoleh aktivitas enzim pada pemakaian kedua, dan seterusnya. Setelah pengujian aktivitas, enzim bromelin amobil dicuci beberapa kali dengan akuades untuk menghilangkan sisa protein, peptida pendek atau asam amino pada uji aktivitas sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemurnian Enzim Bromelin Menggunakan Metode Presipitasi Etanol

Tujuan pemurnian enzim bromelin ini adalah untuk memisahkan enzim dari debris sel, organel sel, sel utuh, asam nukleat, dan asam amino bebas dalam ekstrak kasar. Metode presipitasi etanol dipilih karena toksisitas etanol yang rendah dan waktu pemurnian yang dibutuhkan relatif singkat.

Tabel 1. Ringkasan Pemurnian Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Daging Buah Nanas Menggunakan Metode Presipitasi Etanol

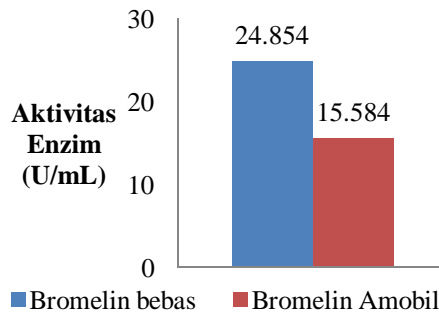
| Preparasi | Aktivitas Total (U) | Total Protein (mg) | Aktivitas Spesifik (U/mg) | Yield (%) | Tingkat Kemurnian |
|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|-----------|-------------------|
| Ekstrak kasar | 1.849,838 | 691,123 | 2,677 | 100 | 1,00 |
| Presipitasi etanol | 745,620 | 89,513 | 8,330 | 40,31 | 3,11 |

Hasil pemurnian enzim bromelin yang diisolasi dari daging buah nanas menggunakan metode presipitasi etanol dapat dilihat pada Tabel 1. Pemurnian enzim bromelin yang diisolasi dari daging buah matang menggunakan etanol meningkatkan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim sekitar 3,11 kali. *Yield* protein hasil pemurnian ini kurang dari 50%. Diduga selama pemurnian, banyak enzim bromelin yang terdenaturasi.

Hasil Amobilisasi Enzim dalam Agar

Amobilisasi enzim bromelin dalam agar dilakukan dengan metode penjebakan. Pada metode ini, enzim dicampur dengan agar dan kemudian terjadi *crosslinking* pada agar. *Crosslinking* ini menyebabkan agar membentuk suatu struktur tertentu yang dapat menjebak gel. Keunggulan metode ini meminimalkan pelepasan enzim dan meningkatkan kestabilannya (Spahn & Minter, 2008: 195).

Gambar 1. menunjukkan aktivitas enzim bromelin amobil relatif terhadap aktivitas enzim hasil presipitasi etanol. Aktivitas enzim bromelin hasil presipitasi etanol mengalami penurunan sekitar 37,30% setelah diamobilisasi.

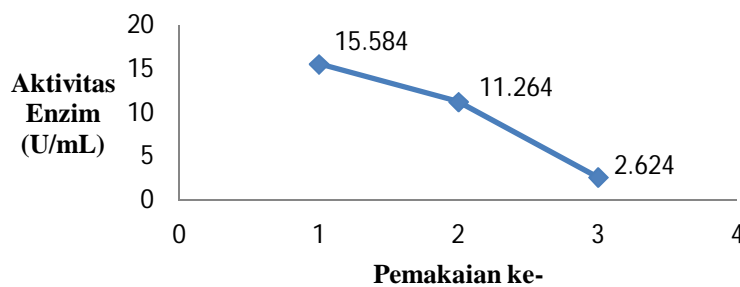


Gambar 1. Aktivitas Enzim Bromelin Hasil Presipitasi Etanol Sebelum dan Sesudah Amobilisasi

Penurunan aktivitas ini diduga akibat denaturasi enzim selama proses amobilisasi atau rendahnya afinitas substrat terhadap enzim amobil (Prakash & Jaiswal, 2011: 577). Dugaan lain adalah terjadinya perubahan kondisi optimum aktivitas enzim bromelin. Setelah diamobilisasi, kondisi optimum aktivitas enzim, seperti pH dan temperatur optimum, cenderung berubah dari kondisi optimum aktivitas enzim bebas. Umumnya terjadi kenaikan pH dan temperatur untuk mencapai aktivitas enzim yang hampir setara dengan aktivitas enzim bebas (Prakash & Jaiswal, 2011: 574; Sebayang, 2006: 23).

Pada penelitian ini, absorbansi pengujian kadar protein air hasil cucian enzim amobil tidak masuk dalam rentang persamaan kuva standar BSA maka konsentrasinya dianggap nol. Oleh karena itu, diasumsikan persen amobilisasi enzim bromelin amobil adalah 100%.

Pengujian aktivitas enzim bromelin amobil juga dilakukan secara berulang untuk mengetahui berapa kali enzim bromelin dapat digunakan. Aktivitas enzim bromelin amobil pada pemakaian berulang ditunjukkan oleh Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas Enzim Bromelin Amobil pada Pemakaian Berulang

Hasil uji aktivitas enzim bromelin pada pemakaian berulang menunjukkan pada pemakaian kedua dan ketiga, aktivitas enzim bromelin yang tersisa secara berturut-turut adalah sekitar 72,28% dan 16,84% aktivitas enzim amobil pada pemakaian pertama. Penurunan aktivitas ini diduga akibat terdenaturasinya enzim selama inkubasi. Menurut Jutamongkon dan Charoenrein (2010: 945-947) aktivitas bromelin terus menurun apabila diinkubasi pada temperatur 50⁰ C dalam waktu yang lama. Pada kondisi tersebut, energi aktivasi untuk denaturasi enzim lebih tinggi daripada energi aktivasi untuk reaksi katalitik sehingga enzim lebih cenderung terdenaturasi daripada melakukan aktivitas katalitiknya.

Diskusi Umum Mengenai Pemurnian dan Amobilisasi Enzim Bromelin

Hasil pemurnian enzim bromelin menggunakan etanol 80% dengan perbandingan 1:4 menunjukkan telah terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim bromelin sekitar 3,11 kali setelah pemurnian. Pemurnian ini menghasilkan *yield* protein sebesar 40,31% dengan tingkat kemurnian sebesar 3,11. Apabila dilihat dari *yield* protein yang diperoleh maka metode pemurnian ini kurang efektif untuk pemurnian bromelin yang diisolasi dari daging buah nanas matang. Oleh karena itu perlu dicari metode pemurnian yang lain untuk menghasilkan *yield* yang tinggi. Apabila dilihat dari meningkatnya aktivitas spesifik ekstrak kasar setelah pemurnian maka enzim bromelin hasil pemurnian ini dapat digunakan untuk amobilisasi enzim.

Amobilisasi enzim bromelin dilakukan dengan menggunakan agar konsentrasi 2%. Pengujian aktivitas enzim bromelin amobil tanpa substrat menunjukkan bahwa tidak ada aktivitas enzim yang terjadi. Artinya tidak ada enzim yang keluar dari dalam matriks pengamobil (agar 2%) dan terdegradasi oleh bromelin. Hal ini diduga gel agar dengan konsentrasi 2% memiliki ukuran pori-pori tertentu yang dapat mencegah lepasnya enzim dari dalam matriks pengamobil. Pengujian aktivitas enzim bromelin amobil menggunakan substrat menunjukkan adanya aktivitas enzim yang terjadi. Artinya ukuran pori-pori agar lebih besar daripada diameter substrat sehingga substrat dapat masuk ke dalam matriks penjebak dan bereaksi dengan enzim.

Aktivitas enzim bromelin hasil presipitasi menggunakan etanol mengalami penurunan sekitar 37,30% setelah diamobilisasi. Enzim bromelin amobil dapat digunakan sebanyak 3 kali. Aktivitas bromelin amobil pada pemakaian pertama, kedua dan ketiga berturut-turut sekitar 15,584 Unit/mL, 11,264 Unit/mL dan 2,624 Unit/mL. Aktivitas bromelin amobil masih tersisa 16,84% pada pemakaian ketiga. Hasil ini menunjukkan agar komersial dengan konsentrasi 2% tidak cukup baik digunakan sebagai matriks pengamobil enzim bromelin dengan kondisi penelitian yang dilakukan sehingga kurang dapat digunakan untuk aplikasi industri. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mencari kondisi optimum aktivitas enzim bromelin amobil ini, antara lain konsentrasi agar komersial dan penambahan aktivator untuk meningkatkan aktivitas bromelin amobil.

KESIMPULAN

Hasil amobilisasi enzim bromelin yang diisolasi dari daging buah nanas matang dalam agar komersial dengan konsentrasi 2% menunjukkan aktivitas enzim bromelin hasil presipitasi etanol mengalami penurunan sekitar 37,30% setelah diamobilisasi menggunakan agar-agar komersial dengan konsentrasi 2%. Aktivitas enzim bromelin amobil mengalami penurunan sekitar 27,72% pada pemakaian kedua dan 83,16% pada pemakaian ketiga, relatif terhadap aktivitas enzim bromelin amobil pada pemakaian pertama. Enzim bromelin amobil dapat dipakai sebanyak 3 kali dengan sisa aktivitas sebesar 16,84% pada pemakaian ketiga. Metode amobilisasi ini kurang efektif bila digunakan untuk aplikasi industri.

DAFTAR RUJUKAN

- Amalia, A & Nawfa, R. 2010. *Amobilisasi Bromelin dengan Menggunakan Kitosan Sebagai Matriks Pendukung*. Skripsi diterbitkan. Surabaya: ITS.
- Esih, P. 2006. *Pengaruh Jenis Presipitan Pada Proses Isolasi Enzim Bromelin dari Buah Nanas terhadap Aktivitas Proteolitik Enzim Pada Hidrolisis Kasein*, (Online), (<http://www.digilib.ui.ac.id/file?file=pdf/abstrak-20247416.pdf>), diakses 5 Oktober 2012.
- Gautam, S. S., Mishra, S. K., Dash, V., Goyal, A. K. & Rath, G. 2010. Comparative Study of Extraction, Purification and Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant. *Thai J. Pharm. Sci*, 34: 67-76.

- ISFI. 2007. *ISO (Informasi Spesialite Obat) Indonesia*. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia: Jakarta.
- Jutamongkon, R. & Charoenrin, S. 2010. Effect of Temperature on the Stability of Fruit Bromelain from Smooth Cayenne Pineapple. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 44 (5): 943-948.
- Ketnawa, Sai-Ut, Theppakorn, Chaiwut & Rawdkuen, S. 2009. Partitioning Of Bromelain From Pineapple Peel (*Nang Lae* Cultv.) By Aqueous Two Phase System. *As. J. Food Ag-Ind*, 2 (04): 457-468.
- Liang, H., Li, M., Shi, M., Liao, A. & Wu, R. 2012. Study on the Stability of Fruit Bromelain. *Advanced Materials Research*, 421: 19-22.
- Li-Chao, Z., Yan, W. & Jic-Lan, C. 2011. Effects or Additives on Bromelain Activity. *Food Science*, 32 (15): 225-229.
- Prakash, O. & Jaiswal, N. 2011. Immobilization of a Thermostable Amylase on Agarose and Agar Matrices and its Application in Starch Stain Removal. *World Appl. Sci. J.*, 13 (3): 577-577.
- Priya, S. P., Jayakumar., Mathai, V., Chintu & Babu, S. 2012. Immobilization and Kinetic Studies of Bromelain: A Plant Cysteine Bromelin From Pineapple (*Ananas comosus*) Plant Parts. *Int J Med Health Sci.*, 1 (3): 10-16.
- Salamah, E., Susanti, D. & Wikanta, T. 2005. Kualitas Agarosa Hasil Isolasi dari *Rhodymenia ciliata* Menggunakan DEAE-Selulosa. *Buletin Teknologi Hasil Pertanian*, 8 (1): 13-20.
- Sebayang, F. 2006. Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nenas serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan. *Jurnal Sains Kimia*, 10 (1): 20-26.
- Secor Jr, E. R., Carson VI, W. F., Cloutier, M. M., Guernsey, L. A., Schramm, C. M., Wu, C. A. & Thrall, R. S. 2005. Bromelain Exerts Anti-Inflammatory Effects in An Ovalbumininduced Murine Model of Allergic Airway Disease. *Cell Immunol.*, 237 (1): 68-75.
- Spahn, C. & Minter, S. D. 2008. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, 2 (3): 195-200.
- Tochi, B. N., Wang, Z., Xu, S. & Zhang, W. 2008. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7 (4): 513-520.
- Tischer, W. & Wedekind, F. 1999. *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*, (Online), (<http://gertrude-old.case.edu/276/materials/web/immobilizedenzymereview.pdf>), diakses 12 Oktober 2012.
- Twyman, R. M. *Immobilized Enzymes*, (Online), (www.writescience.com/RMT%20PDFs/Elsevier/eans%20immobenz.pdf), diakses 7 Oktober 2012.
- Xiong, J., Narayanan, J., Liu, X., Chong, T. K., Chen, S. B. & Chung, T. 2005. Evolution and Gelation Mechanism of Agarosa Gel. *J. Phys. Chem. B*, 109 (12): 5638-5643.