

TESIS

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI (*Staphylococcus aureus*) DAN
TOKSISITAS (*Artemia salina* Leach) EKSTRAK BROMELIN
BONGGOL NANAS (*Ananas comusus* L. Merr.)**

**Antibacterial Potensial Test (*Staphylococcus aureus*) And Toxicity
(*Artemia salina* Leach) Bromelain Extract Pineapple core
(*Ananas comusus* L. Merr.)**

ERNA IRAWATI A.



PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI (*Staphylococcus aureus*) DAN
TOKSISITAS (*Artemia salina* Leach) EKSTRAK BROMELIN
BONGGOL NANAS (*Ananas comusus* L. Merr.)**

*Antibacterial Potensial Test (*Staphylococcus aureus*) And Toxicity
(*Arthemia salina* Leach) Bromelain Extract Pineapple core
(*Ananas comusus* L. Merr.)*

TESIS

*Diajukan untuk melengkapi salah satu syarat
untuk mencapai gelar Magister Kedokteran Gigi*



ERNA IRAWATI

J012202004

PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

PENGESAHAN TESIS

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI (*Staphylococcus aureus*) DAN TOKSISITAS
(*Artemia salina* Leach) EKSTRAK BROMELIN BONGGOL NANAS
(*Ananas comusus* L. Merr.)**

**ERNA IRAWATI A.
NIM J012202004**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian Studi Program Magister Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 26 Januari 2022

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. drg. Asmawati Amin, M.Kes
NIP. 196810281998022002

Dr. Lenni Indriani, drg., M.kes
NIP. 197605132005012002

Ketua Program Studi
Magister Kedokteran Gigi

Fuad Husain Akbar, drg., MARS, PhD
NIP. 198550826 201504 001

Dekan
Fakultas Kedokteran Gigi

Prof. Dr. Edy Machanad, drg., Sp. Pros(K)
NIP. 196311041994011001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245
Telepon (0411) 586012, 584641 Faximile. (0411) 584641
Laman: dent.unhas.ac.id, Email: fdhu@unhas.ac.id

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Erna Irawati A
NIM : J0122 02 004
Konsentrasi : Dental Material
Program Studi : Magister Ilmu Kedokteran Gigi FKG Unhas

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Adapun bagian-bagian tertentu dalam penulisan tesis yang saya kutip dari hasil karya orang lain telah dituliskan dengan sumbernya secara jelas sesuai dengan norma, kaidah dan etika pedoman penulisan tesis.

Apabila kemudian hari terbukti dan dapat dibuktikan Sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Januari 2023

Yang menyatakan,

Erna Irawati A.
NIM.J012202004

ABSTRAK

ERNA IRAWATI. *Uji Potensi Antibakteri dan Toksisitas Ekstrak Bromelain Bonggol Nanas (Ananas Comosus L. Merr) untuk Pemanfaatan Terapi Halitosis* (dibimbing oleh Asmawati Amin dan Lenni Indriyani).

Halitosis adalah masalah di rongga mulut yang terjadi sekitar 15% - 60% populasi manusia. Halitosis dibentuk oleh senyawa *volatile sulphur compounds* (VSC) yang mudah menguap. Diproduksi terutama oleh bakteri anaerob, yang bereaksi dengan protein di rongga mulut, yang selanjutnya akan dipecah menjadi asam amino. Untuk pencegahan diperlukan suatu agen antibakteri. Nanas memiliki kandungan enzim bromelain dipercaya memiliki aktivitas antibakteri dengan cara memutus ikatan protein bakteri. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi aktivasi antibakteri bromelain dari bonggol nanas (*ananas comosus l. merr*) terhadap pertumbuhan bakteri (*staphylococcus aureus*) dan toksisitasnya (*brine shrimp*). Metode yang digunakan adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro* menggunakan metode difusi sumuran untuk aktivitas antibakteri dan *brine shrimp lethality test* (BSLT) untuk toksisitas. Bromelain diisolasi dari bonggol nanas menggunakan metode maserasi, kemudian dimurnikan dengan metode presipitasi dan diidentifikasi dengan *fourier-transform infrared* (FTIR). Bakteri yang digunakan adalah *staphylococcus aureus* yang diambil dari swab pada permukaan dorsal lidah pasien halitosis diidentifikasi dengan pewarnaan gram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat daya hambat yang ditandai zona bening pada konsentrasi 50%, 75%, 100%, dan chlorheksidine 0,2% sebagai kontrol positif dengan perbedaan yang signifikan. Zona daya hambat berbanding lurus dengan semakin meningkatnya konsentrasi. Dapat disimpulkan bahwa bromelain memiliki potensi aktivitas antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan untuk terapi halitosis.

Kata kunci: bromelain, bonggol nanas, antibakteri, VSC



ABSTRACT

ERNA IRAWATI. *Test of Potential Antibacterial Activity and Toxicity of Bromelain from Pineapple Core Extract for Halitosis Therapy Utilization* (Supervised by Asmawati Amin and Lenni Indriyani).

Halitosis is an oral problem that affects approximately 15% to 60% of the population. Halitosis is formed by volatile sulfur compounds (VSC) produced mainly by anaerobic bacteria, which come into contact with proteins in the oral cavity which will then break down into amino acids. For prevention, it requires an antibacterial agent. Pineapple contains the enzyme bromelain which is believed to have antibacterial activity by breaking bacterial protein bonds. This study is to determine the potential antibacterial activation of bromelain from pineapple weevil (*Ananas comusus L. Merr*) on bacterial growth (*staphylococcus aureus*) and its toxicity (brine shrimp). This research was an *in vitro* experimental laboratory study using the well diffusion method for antibacterial activity and the Brine shrimp lethality test (BSLT) for toxicity. In this study, bromelain was isolated from pineapple humps using the maceration method, then purified by the precipitation method and identified by Fourier-transform infrared (FTIR). The bacteria used was *Staphylococcus aureus* which was taken from a swab on the dorsal surface of the tongue of a halitosis patient, identified by gram staining. In this study, there is an inhibition marked by a clear zone at concentration of 50%, 75%, 100% and 0.2% chlorhexidine as a positive control with a significant difference. The Zone of inhibition is directly proportional to the increasing concentration. Bromelain has potential antibacterial activity for halitosis therapy utilization.

Keywords: bromelain, pineapple core, antibacterial, VSC



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
PENGESAHAN TESIS.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI.....	vii
BAB I PENDAHULUAN	11
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tinjauan Umum Nanas (<i>Ananas comusus</i> L. Merr)	6
B. Bromelin	10
C. uji aktivitas antibakteri	16
D. Uji toksisitas.....	22
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	24
A. Kerangka Teori.....	24
B. Kerangka Konsep	25
C. Hipotesis Penelitian.....	26
D. Hipotesis Alternatif (Ha).....	26
BAB IV METODE PENELITIAN	27
A. Jenis dan Desain Penelitian.....	27
B. Lokasi dan Waktu Penelitian	27
C. Identifikasi Variabel.....	27
D. Definisi Operasional	28
E. Subjek dan objek penelitian	28
F. Besar Sampel	29

G. Prosedur Penelitian.....	32
H. Pengumpulan, Pengolahan, analisa dan Penyajian Data.....	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
A. Hasil penelitian	42
B. Pembahasan.....	51
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	58
A. KESIMPULAN	58
B. SARAN.....	58
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

Tabel 1 uji identifikasi bakteri	45
Tabel 2 uji daya aktivasi antibakteri ekstrak crude dan murni bromelin	46
Tabel 3 Perbedaan rata-rata ekstrak crude dan murni bromelin antar konsentrasi dari bonggol Nanas dalam menghambat pertumbuhan bakteri.....	47
Table 4 Perbedaan rata-rata antara ekstrak crude dan murni bromelin dari bonggol Nanas dalam menghambat pertumbuhan bakteri	
Tabel 5 hasil uji KHM dan KBM ekstrak crude dan murni bromelin	47
Tabel 6 Hasil uji toksisitas ekstrak crude bromelin bonggol Nanas (<i>Ananas comusus</i> L.Merr)	48
Tabel 7 Hasil uji toksisitas ekstrak murni bromelin bonggol Nanas (<i>Ananas comusus</i> L.Merr)	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 morfologi Nanas (<i>Ananas comusus</i> L.Merr).....	13
Gambar 2 Bentuk Mikroskopis <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Gambar.3 larva <i>Artemia salina</i>	31
Gambar 4 <i>Ananas comusus</i> L. Merr.....	50
Gambar 5 Kurva FTIR Enzym Bromelin dari Ekstrak bonggol Nanas	51
Gambar 7 konsentrasi hambat minimal ,(a) crude, (b) murni	59
Gambar 8. Kurva regresi linear nilai probit bromelin crude.....	61
Gambar 9. Kurva regresi linear nilai probit bromelin murni	62

DAFTAR LAMPIRAN

1. Surat izin penelitian.....	74
2. Surat izin etik	75
3. Surat bebas penelitian	76
4. Dokumentasi penelitian.....	79
5. Hasil analisis SPSS	85
6. Tabel probit	99

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pemanfaatan tumbuhan yang memiliki khasiat terhadap kesehatan sudah sejak lama dilakukan oleh masyarakat, karena secara empiris tumbuhan mempunyai efek samping yang minim dan lebih ekonomis karena mudah didapatkan. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi bagi kesehatan adalah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr.) (Ghisa *et al.*, 2019; Ziganshina *et al.*, 2020)

Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) merupakan tanaman yang tumbuh subur di Indonesia. Nanas salah satu jenis tanaman buah-buahan yang berumpun dan dipanen terus-menerus. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman Nanas memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian yang dilakukan (Loon *et al.*, 2018), menyimpulkan bahwa ekstrak Nanas memiliki efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* karena senyawa bromelin dan faktor fitokimianya seperti Vitamin C dan flavonoid dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak Nanas adalah 0,78%-1,56%. Penelitian yang dilakukan oleh Wiharningtias and Waworuntu, (2016) membuktikan bahwa ekstrak kulit memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pemanfaatan limbah tanaman Nanas berupa batang, daun, kulit dan bonggol belum dimanfaatkan secara optimal, padahal bagian dari tanaman

Nanas tersebut mengandung beberapa komponen aktif salah satunya adalah enzim bromelin yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antiinflamasi dan analgesik. Kandungan enzim bromelin lebih banyak terdapat pada bagian bonggol Nanas yang biasanya dibuang. Dari beberapa penelitian yang sudah dilakukan, enzim bromelin dapat menghambat pertumbuhan bakteri anaerob dan bakteri aerob (Abbas, Shanbhag and Kothare, 2021; Gul *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021).

Staphylococcus aureus adalah bakteri pathogen gram-positif an aerob fakultatif yang bersifat invasive dan merupakan flora normal pada kulit, saluran nafas bagaian atas dan rongga mulut. *Staphylococcus aureus* merupakan pathogen paling utama pada manusia (Jawedz, *et al.*, cit Karimela *et al.*, 2017).

Enzim bromelin mudah diperoleh karena Nanas dipanen secara terus-menerus berbuah sepanjang tahun, tersebar di seluruh Indonesia yang merupakan produsen ke-4 di dunia. Tahun 2019 Sulawesi Selatan menghasilkan 473.470 rumpun dengan buah sebanyak 2.898 ton, tahun 2021 menghasilkan 21.110 kuintal (BPS, 2022). Produksi buah Nanas yang cukup tinggi akan menyumbangkan limbah yang banyak pula, berupa batang, daun dan bonggol. Limbah Nanas yang berlimpah dapat dimanfaatkan secara optimal untuk menghasilkan produk yang memiliki nilai ekonomi lebih tinggi, misalnya sebagai sumber enzim bromelin. Manfaat bromelin yang cukup luas di bidang farmakologi, kosmetik dan industri makanan, mendorong banyak peneliti mempelajarinya lebih lanjut.

Berdasarkan studi literatur, Nanas ditinjau dari aktivitas farmakologi dapat dikembangkan menjadi sediaan farmasi sehingga perlu ditelaah mengenai aspek toksisitas. Uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine shrimp Lethal Test* (BSLT) dimaksudkan untuk menentukan potensial suatu senyawa sebagai racun dengan mengetahui tingkat toksisitas dan sitotoksik suatu ekstrak dan potensi senyawa sebagai antikanker (Debnath, dkk., 2021).

Berdasarkan uraian di atas, penting suatu pengembangan bahan alternatif dari alam dengan pemanfaatan limbah dari tanaman Nanas secara optimal. Penelitian tentang aktivitas antibakteri ekstrak tanaman Nanas (kulit, daun, mahkota, batang dan bonggol) telah banyak dilakukan namun penelitian tentang uji aktivitas antibakteri (*Staphylococcus aureus*) dan uji toksisitas (*Brine shrimp*) ekstrak bromelin pada bonggol Nanas belum pernah dilakukan.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak crude dan murni bromelin bonggol Nanas dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%; 12,5%; dan 6,25% memiliki potensi aktivitas antibakteri?
2. Apakah terdapat perbedaan ekstrak crude dan murni bromelin bonggol Nanas (*Ananas comosus* (L.) dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%; 12,5%; dan 6,25% dalam menghambat pertumbuhan bakteri?

3. Apakah terdapat perbedaan ekstrak crude dan murni bromelin dari bonggol Nanas dalam menghambat pertumbuhan bakteri?
4. Apakah ekstrak bromelin bonggol Nanas (*Ananas comosus L.*) dengan konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm memiliki aktivitas toksisitas?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui potensi antibakteri dan toksisitas ekstrak bromelin bonggol Nanas (*Ananas comosus L. Merr.*) untuk pemanfaatan terapi halitosis

2. Tujuan Khusus

- a) untuk mengetahui ekstrak crude dan murni bromelin bonggol Nanas dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%; 12,5%; dan 6,25% memiliki potensi aktivitas antibakteri
- b) untuk mengetahui perbedaan ekstrak crude dan murni bromelin bonggol Nanas (*Ananas comosus (L.)*) dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%; 12,5%; dan 6,25% dalam menghambat pertumbuhan bakteri
- c) untuk mengetahui perbedaan antara ekstrak crude dan murni bromelin dari bonggol Nanas dalam menghambat pertumbuhan bakteri
- d) untuk mengetahui ekstrak bromelin bonggol Nanas (*Ananas comosus (L.)*) dengan konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm memiliki aktivitas toksisitas.

D. Manfaat Penelitian

ilmiah

Memberikan informasi ilmiah sebagai sumber data awal dan referensi bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang dental material dengan pemanfaatan potensi dari bahan alami yang aman.

Memberikan informasi kepada produsen suatu inovasi yang dapat menjadi bahan dasar sediaan permen karet sebagai antibakteri dari alam untuk mengatasi halitosis.

Institusi

Dapat menjadi sumber data dan referensi bagi peneliti selanjutnya yang akan melakukan penelitian yang berkaitan dengan penelitian ini.

Praktis

Menambah ilmu pengetahuan, wawasan dan pengalaman kepada peneliti dalam melakukan penelitian dan penulisan karya tulis ilmiah.

BAB II

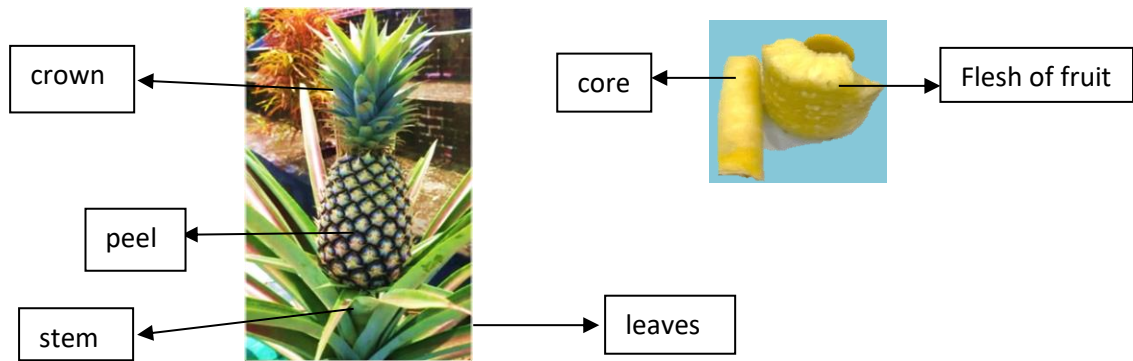
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Nanas (*Ananas comusus* L. Merr)

Spesies ini diperkenalkan di Eropa oleh Christopher Columbus yang membawa pina de indes, yaitu tanaman ‘ pinus orang India’ dari Guadeloupe ke Spanyol tahun 1493(Chwil and Skoczylas , 2020).

Nanas merupakan famili Bromeliaceae memiliki sekitar 2794 spesies dan terdiri dari 56 genera. Nanas dikenal dengan nama latin yaitu *Ananas comusus* (L.) Merr. (syn. *A. sativus* Schult.F., *Ananassa sativa* Lindl., *Bromelia ananas* L., *B.comosa* L.). Tanaman Nanas berasal dari Amerika tropis, yakni Brazil, Argentina, dan Peru. Saat ini, Nanas telah tersebar ke seluruh dunia, terutama di sekitar khatulistiwa antara 30°LU dan 30°LS (Wali, 2018). Varietas Nanas yang banyak ditanam di Indonesia adalah golongan cayenne dan queen, sedangkan sekarang yang dikategorikan unggul adalah Nanas Bogor, Subang dan Palembang. Golongan spanish dikembangkan di Kepulauan India Barat, Puerte Rico, Mexico dan Malaysia. Golongan abalaxi banyak dikembangkan di Brazilia (Aeni Q., *et al.*, 2022).

Nanas merupakan tanaman buah berupa semak, dengan ujung daun dan tepi daun yang berduri dan memiliki tulang daun yang sejajar. Kemudian memiliki kulit yang berwarna hijau kekuning-kuningan, serta daging buah berwarna kuning. Susunan tanaman Nanas terdiri dari bagian utama meliputi : akar, batang, daun, bunga dan buah (daging buah) dan bonggol (gambar 1)



Gambar 1 morfologi Nanas (*Ananas comusus* L.Merr)

Sumber : dokumentasi pribadi

Adapun penjelasannya adalah sebagai berikut (Hadiyati, 2009; BPS Sulawesi Selatan, 2022)

1. Akar: Nanas tumbuh di tanah dengan menggunakan akar. Akarnya berupa akar tunggang dengan susunan akar serabut, bercabang banyak, berbentuk bulat sampai agak persegi dengan posisi tegak dan berbatang lemah
2. Batang: Nanas merupakan herba tahunan atau dua tahunan dengan tinggi 50-150 cm dan memiliki tunas yang keluar pada bagian pangkalnya. Batang berwarna kehijauan sampai keunguan dengan ruas berwarna hijau, bergantung pada varietasnya.
3. Daun: daun berkumpul dalam roset akar dan pada bagian pangkalnya melebar menjadi pelepah daun. Helaiian daun berbentuk pedang, tebal, liat dengan panjang 80-120 cm, lebar daun kisaran antara 2-6 cm. Warna daunnya adalah hijau atau hijau kemerahan.
4. Bunga: bunga Nanas bersifat inflorescente, tumbuh dari titik tumbuh batang tanaman. Bunga tersebut muncul sekitar 450 hari sesudah tanam. Bunganya

bermaprodit, yang memiliki 3 kelopak dan 3 mahkota yang bunganya mekar di pagi hari.

5. Buah : buah Nanas bukan buah sejati, melainkan gabungan buah-buah sejati, yang bekasnya terlihat dari setiap sisik pada kulit buah. Buahnya tergolong buah bumi majemuk dengan bentuk bulat panjang, berdaging. Rasa buah Nanas manis hingga asam dengan berat buah kurang lebih 0,9-1,8 kg.
6. Bonggol Nanas: bagian tengah Nanas yang keras kerap disisihkan atau bahkan dibuang karena memiliki tekstur yang keras dan sulit untuk dikonsumsi dan banyak mengandung bromelin.

Taksonomi Nanas (*Ananas comusus L. Merr*)

Dalam sistematika tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Monocotyledonease
Ordo	:	Poales
Famili	:	Bromeliaceae
Genus	:	ANanas
Spesies	:	ANanas cumusus L. Merr

(Yumiati, 2017)

Berdasarkan bentuk daun dan buah dikenal 4 jenis Nanas, diantaranya cayenne (daun halus, tidak berduri, buah besar), queen (daun pendek berduri tajam, buah lonjong mirip kerucut), spanyol atau Spanish (daun panjang kecil, berduri halus sampai kasar, buah bulat dengan mata datar), dan abacaxi (daun panjang berduri kasar, buah silindris, atau seperti piramida). Jenis Nanas yang terdapat pada

perkebunan di Indonesia adalah golongan cayenne dan queen. Sementara untuk golongan Spanish telah dikembangkan di kepulauan India Barat, Puerte Rico, Mexico, dan Malaysia.

Senyawa kimia Nanas (*Ananas comusus L. Merr*)

Menurut beberapa penelitian buah Nanas mengandung vitamin (A dan C), mineral (kalsium, fosfor, magnesium, besi, natrium), glukosa, fruktosa, sukrosa, protein, senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, tannin, dan steroid dan enzim bromelin. Bromelin adalah Enzim Proteolitik yang ditemukan pada bagian tangkai, batang, daun, buah, maupun kulit dalam jumlah yang berbeda. Saat ini limbah yang banyak dihasilkan dari industri buah Nanas, umumnya limbah Nanas yang berupa batang, kulit, daun dan bonggol belum dimanfaatkan secara optimal (Andre Manaroinsong; Megawati, 2020)

Kandungan metabolit primer dan sekunder tanaman Nanas di setiap bagian berbeda. Bagian akar mengandung saponin dan tanin (Megawati, 2020). Bagian batang mengandung karbohidrat, asam amino, protein, saponin, flavonoid, dan alkaloid. Bagian daun mengandung karbohidrat, protein, asam amino, vitamin C, alkaloid, tanin, flavonoid, terpenoid, fenolik, dan bromelin. Bagian kulit mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan bromelin. Bagian buah mengandung asam amino, peptida, protein, karbohidrat, lipid, terpenoid, flavonoid, alkaloid, dan fenolik (Jovanoic *dkk*, 2018)

B. Bromelin

Enzim bromelin merupakan suatu enzim endopeptidase yang mempunyai gugus sulfhidril pada pusat aktifnya. Bromelin merupakan ekstrak protein kasar dari berbagai organ (batang, daun, buah) dan bagian infructescence (mahkota, kulit, inti) dari beberapa spesies genus *Ananas* dari keluarga *Bromeliaceae* (Bresolin *et al.* 2013; Ali *et al.* 2015; Vicente *et al.* 2016; Das and Bhattacharyya 2017; Kahiro *et al.* 2017; Hatano *et al.* 2018; Kargutkar and Brijesh 2018; Saptarini *et al.* 2019).

Bromelin merupakan enzim yang susunan utamanya berupa protein sehingga konsentrasi protein menunjukkan banyaknya bromelin yang terkandung pada setiap bagian dari tiap varietas Nanas.

Sumber bromelin

Bromelin merupakan enzim yang berasal dari tumbuhan keluarga *Bromeliaceae*, dan beberapa penelitian menyatakan bahwa kandungan bromelin terbanyak terdapat pada tumbuhan Nanas. Suatu penelitian dilakukan oleh Omotoyinbo dan Sanni (2017) yang bertujuan untuk mengetahui varietas Nanas yang memiliki kandungan bromelin terbanyak. Varietas Nanas yang diuji banding merupakan varietas yang umum dipasaran dan varietas yang terdapat di wilayah Nigeria. Penelitian pada ekstrak kasar bonggol buah Nanas diperoleh bahwa ekstrak mengandung enzim bromelin, peroksida, asam fosfat, beberapa protease inhibitor, dan senyawa organik yang mengikat kalsium.

Enzim bromelin didapatkan pada batang dan pada limbah buah Nanas seperti kulit, bonggol, crown dan daun (Abbas, Shanbhag and Kothare, 2021). Penelitian yang dilakukan oleh Zhou, *et al.* (2021) menyatakan bahwa aktivitas

enzim bromelin, hasil enzim, dan aktivitas spesifik enzim bromelin lebih banyak terdapat pada bagian kulit Nanas dibandingkan dengan bagian batang dan daging buah. Kandungan enzim bromelin lebih banyak terdapat pada bagian batang Nanas. Sedangkan menurut Supartono dalam Maryam (2009) kandungan enzim lebih banyak di bagian daging buahnya dibandingkan pada bagian batangnya.

Nanas (*Ananas comusus* L. Merr yang berasal dari Amerika Selatan (Brasil tenggara, Argentina dan Uruguay) dan dibudidayakan di Amerika Tengah (Hawai, Costarica) serta negara Asia termasuk Filipina, Thailand, Indonesia, Malaysia, India dan Cina merupakan sumber bromelin yang paling terkenal (Hikisz and Bernasinska-Slomczewska, 2021).

Karakteristik bromelin

Kerja bromelin sebagai enzim tentunya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu, sehingga untuk mengetahui karakteristik dari enzim bromelin, perlu ditentukan pula kondisi optimum enzim bromelin dalam melakukan aktivitasnya. Beberapa penelitian menentukan suhu dan pH optimum dengan cara melihat aktivitas bromelin sebagai protease atau pencerna protein pada variasi suhu dan pH. Pengaruh suhu pada aktivitas bromelin berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Martin, *et al.* (2014), aktivitas enzim bromelin kasar meningkat dengan meningkatnya suhu sampai mencapai 50° C, dan akan menurun dengan cepat dan untuk bromelin yang murni, aktivitas akan meningkat hingga mencapai suhu 60°C, dan akan mulai menurun setelahnya. Pengaruh pH pada aktivitas enzim berdasarkan penelitian Martin, *et al.* (2014), menunjukkan adanya kenaikan aktivitas ekstrak bromelin kasar hingga mencapai pH 7,0 dan akan sedikit aktivitas

penolakan pada pH 10. Sedangkan untuk ekstrak bromelin yang telah dimurnikan aktivitasnya naik hingga pH 8. Hasil yang sama juga didapatkan pada penelitian Ketnawa, *et al.* (2012) yang menganalisis dua varietas dari *Ananas comosus*, yang menjelaskan bahwa aktivitas enzim yang tinggi berada pada rentang pH 6,5 hingga 8,0 dan untuk aktivitas maksimum enzim berada disekitar pH 7,0.

Supartono dalam Maryam (2009) menemukan bahwa enzim protease buah Nanas merupakan endopeptidase netral termostabil, aktivitas optimum ditunjukkan pada pH 7,5 dan suhu 70 °C dengan waktu inkubasi 40 menit .

Salah satu faktor yang dapat memengaruhi aktivitas enzim adalah suhu. Suhu yang tinggi dapat mempercepat pemecahan dan menurunkan aktivitas enzim. Namun, semakin tinggi suhu (dalam batas optimum) semakin aktif pula enzim tersebut. Pada suhu yang melebihi suhu optimum ini keadaan sisi aktif enzim tidak dapat lagi bekerja terhadap substrat. Setelah suhu dinaikkan di atas suhu optimum energi sistem menjadi sangat tinggi. Sehingga ikatan peptida dan ikatan disulfida terganggu, akibatnya enzim menjadi tidak aktif (Poba *et al.*, 2019).

Isolasi enzim bromelin dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya; Teknik Kromatografi, filtrasi membran, presipitasi menggunakan ammonium sulfat, etanol, PEG, dapat juga digunakan mesoporous silika (Nathania, 2018).

Aktivitas bromelin

Enzim bromelin memiliki manfaat yang sangat banyak bagi kehidupan manusia. Banyaknya kegunaan bromelin baik dalam kehidupan sehari-hari sebagai pengempuk daging dan dalam bidang kesehatan memunculkan berbagai penelitian terhadap aktivitas bromelin diantaranya yaitu:

1. Anti-inflamasi

Bromelin dapat menurunkan regulasi tingkat ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX2) dan Prostaglandin E2 (PGE-2) dalam sel mikroglia murine dan garis sel leukemia monositik manusia. Bromelin pula mengaktifkan mediator inflamasi termasuk interleukin (IL)-1 β , IL6, interferon (INF)- γ dan tumor necrosis factor (TNF)- α dalam makrofag tikus dan sel mononuclear darah perifer manusia. Dengan demikian, bromelin menurunkan sebagian besar mediator inflamasi dan telah menunjukkan peran yang signifikan sebagai agen anti-inflamasi (Wiyati and Tjitraresmi, 2018; Badriyya *et al.*, 2020; Mameli, Natoli and Casu, 2021)

2. Anti kanker

Bromelin telah terbukti secara selektif menginduksi apoptosis dalam sel tumor oleh peningkatan regulasi ekspresi p53 dan inisiasi jalur apoptosis mitondria melalui peningkatan ekspresi Bax dan pelepasan sitokrom C. Selain itu, bromelin menurunkan aktivitas regulasi kelangsungan hidup sel sehingga memicu apoptosis sel yang telah mati pada tumor (Wiyati and Tjitraresmi, 2018; Hikisz and Bernasinska-Slomczewska, 2021; Mameli, Natoli and Casu, 2021)

3. Antibakteri

Enzim Bromelin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesi sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Enzim Bromelin juga mempunyai target pada polipeptida dinding

sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati . Zat-zat dalam enzim bromelin dapat mengubah sifat fisik dan kimiawi selaput sel dan dapat menghalangi fungsi normalnya sehingga mampu menghambat dan membunuh bakteri tersebut (Hikisz and Bernasinska-Slomczewska, 2021; Nurnaningsih and Laela, 2022)

Suplementasi bromelin melindungi hewan terhadap diare yang disebabkan oleh enterotoksin bakteri dari *Eschericia coli* dan *Vibrio cholera*. Bromelin bertindak sebagai antiadhesi dengan memodifikasi situs reseptor dan mempengaruhi jalur sinyal sekresi usus (Wiyati and Tjitraresmi, 2018)

4. Anti jamur

Bromelin sebagai anti jamur bertindak dengan menstimulasi fagositosis dan menghambat semburan pernapasan *Candida albicans* ketika diinkubasi dengan tripsin secara in vitro (Hikisz and Bernasinska-Slomczewska, 2021; Mameli, Natoli and Casu, 2021)

5. Aktivitas fibrinolitik (Efek terhadap koagulasi darah dan fibrinolysis)

Bromelin mempengaruhi koagulasi darah dengan meningkatkan kemampuan serum fibrinolitik dan menghambat sintesis fibrin, protein yang terlibat dalam pembekuan darah. Studi in vitro dan in vivo telah menunjukkan bahwa bromelin adalah agen fibrinolitik yang efektif karena merangsang konversi plasminogen menjadi plasmin, sehingga

meningkatkan fibrinolisis dengan mendegradasi fibrin(Arefin et al., 2020; Abbas, Shanbhag and Kothare, 2021).

Enzim bromelin dapat digunakan untuk menghambat agregasi platelet dengan cara menurunkan produksi tromboksan A2 yang merupakan salah satu zat kimia atau faktor untuk pembekuan darah, sinusitis, trauma pasca operasi, thrombophlebitis, pyelonephritis, angina pectoris, bronchitis, dan peningkat absorpsi obat seperti antibiotic dan penghilangan eschar pada luka bakar (Hirche *et al.*, 2020). Bromelin juga dapat menjadi anti tumor, modulator imunitas, membantu proses digestif, meningkatkan penyembuhan luka, dan meningkatkan sirkulasi kardiovaskular (Nathania, 2018).

Metode ekstraksi

Metode isolasi enzim merupakan tahapan penting dalam memperoleh enzim dari sumbernya. Cara sederhana dalam mengisolasi enzim bromelin yakni dengan pengendapan. Enzim bromelin mudah diendapkan dengan mengurangi air bebas dalam filtrat buahnya. Beberapa penelitian telah dilakukan dalam mengisolasi enzim bromelin dapat menggunakan garam ammonium sulfat dan aseton sebagai bahan pengendap. Garam ammonium sulfat merupakan salah satu bahan yang mampu mengikat air bebas. Sifat amonium sulfat yang sangat larut dalam air dan tidak bereaksi dengan enzim ini membuat garam ini dapat digunakan dalam isolasi bromelin(Nuhrayati *et al.*, 2018; Dewi, Sundara and Fusvita, 2020). Selain penggunaan garam ammonium sulfat, teknik isolasi yang sederhana dan ekonomis juga dapat

menggunakan beberapa jenis garam. Garam yang dapat digunakan di antaranya adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan NaCl (Kusuma Pramushinta, 2018).

C. Uji Aktivitas Antibakteri

Mikrobiologi merupakan ilmu pengetahuan tentang makhluk hidup yang berukuran sangat kecil, hanya dapat dilihat oleh mikroskop (bahasa Yunani: *micros* artinya kecil, *bios* artinya hidup, *logos* artinya ilmu). Contoh dari makhluk hidup tersebut adalah bakteri. Bakteri dapat dibedakan dari bentuknya maupun melalui pengecatan Gram. Bakteri umumnya mempunyai ukuran sel 0,5-1,0 μm X 2,0-5,0 μm , dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bulat atau kokus, batang atau *bacillus*, dan bentuk spiral (Pelczar and Chan, 2006; Pratiwi, 2008). Mikroorganisme yang sering dipakai sebagai mikroba uji antara lain *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*, serta masih banyak bakteri lainnya.

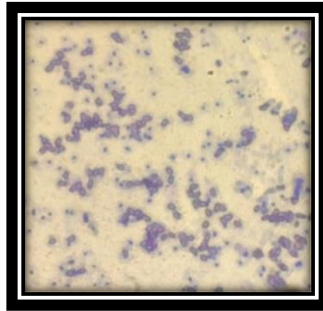
Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat, berdiameter 0,7-1,2 μm , seperti buah anggur, tersusun berkelompok dan tidak teratur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C, membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri. Bakteri ini merupakan bakteri patogen pada kulit, mulut, dan saluran nafas bagian atas. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *S. aureus* yang patogen bersifat

invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulase, dan mampu meragikan manitol.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang merupakan bakteri komensal dalam rongga mulut yang akan bersifat pathogen jika terdapat dalam jumlah yang berlebihan dan dapat menyebabkan halitosis. Bakteri ini akan memecah substrat protein menjadi rantai peptida dan asam amino yang mengandung sulfur seperti *methionin*, *cysteine* dan *cystine*. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang bereaksi dengan protein-protein di dalam rongga mulut dan selanjutnya akan dipecah menjadi asam amino. Asam amino tersebut akan mengalami proses kimiawi (reduksi) yang selanjutnya akan menghasilkan *Volatile Sulfur Compound* (VSC), yaitu *methil mercaptan* (CH₃SH), *hidrogen sulfida* (H₂S) dan *dimethyl sulfida* (CH₃)₂S. Sehingga dalam mengatasi halitosis harus dapat menurunkan jumlah bakteri tersebut di dalam rongga mulut (Anggaraini, Pintauli and Nainggolan, 2021).

Sistematika bakteri *Staphylococcus aureus* adalah (Dwidjoseputro, 2003):

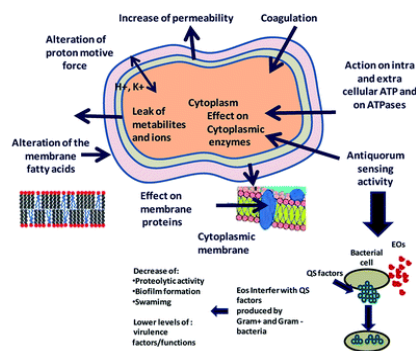
Kingdom	:	Procaryota
Divisi	:	Protophyta
Kelas	:	Schizomycetes
Ordo	:	Eubacteriales
Famili	:	Micrococcaceae
Genus	:	<i>Staphylococcus</i>
Spesies	:	<i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2 Bentuk Mikroskopis *Staphylococcus aureus*
 Sumber: dokumentasi pribadi

Mekanisme kerja antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau metabolisme bakteri yang memiliki sifat membunuh bakteri terutama bakteri yang merugikan manusia yang biasanya menyebabkan infeksi. Antibakteri terbagi menjadi 2, yaitu bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan bakteriosid (membunuh bakteri). Faktor yang memengaruhi aktivitas antibakteri diantaranya adalah pH lingkungan, komponen pembenihan bakteri, stabilitas zat aktif, besarnya inokulum, lamanya inkubasi dan aktifitas metabolik bakteri (Audies, 2015).



Gambar 3. Mekanisme Tindakan dan target jaringan metabolit sekunder tanaman pada sel mikroba
 Sumber: google

1. Kerusakan pada dinding sel

Bakteri memiliki lapisan luar yang disebut dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran protoplasma dibawahnya (Suryaningrum, 2009). Senyawa antibakteri pada daging Nanas yang memiliki kemampuan untuk merusak dinding sel bakteri adalah enzim bromelin dengan mekanisme kerja mengubah atau merusak struktur dinding sel bakteri yang mengandung protein. Bromelin akan memecah dan mendenaturasi protein penyusun dinding sel bakteri, akibatnya dinding sel bakteri akan melemah dan menyebabkan sel mengalami kebocoran atau pecah.

2. Perubahan permeabilitas sel

Beberapa antibiotik mampu merusak atau melemahkan fungsi ini yaitu memelihara integritas komponen-komponen seluler. Zat yang mampu menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas sel bakteri adalah asam sitrat yang terkandung dalam daging Nanas. Asam sitrat memiliki kemampuan merusak membran bakteri dan memisahkannya dengan sel.

3. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasi protein dan asam-asam nukleat sehingga merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi. Zat antibakteri pada daging Nanas yang mampu menyebabkan terjadinya perubahan molekul protein dan asam nukleat adalah Flavonoid dengan mekanisme kerja mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri tanpa dapat diperbaiki lagi.

4. Penghambat kerja enzim

Setiap enzim yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel.

5. Menghambat sintesis asam nukleat dan protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan sangat penting didalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang tejadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

Metode Uji aktivitas antimikroba

Ada beberapa jenis metode dalam uji aktivitas antimikroba seperti :

1. Metode Difusi

Metode ini paling sering digunakan adalah metode difusi agar menggunakan cakram kertas, cakram kaca, pencetak lubang dalam menentukan kerentanan patogen mikroba terhadap obat-obatan antimikroba. Prinsip metode ini adalah dengan mengukur zona hambatan pertumbuhan mikroba yang terjadi akibat difusi zat yang bersifat sebagai antibakteri didalam media padat melalui pencadang. Daerah hambatan mikroba adalah daerah bening yang merupakan zona hambat di sekitar cakram. Luas zona hambat berbanding lurus dengan aktivitas antimikroba, semakin kuat daya aktivitas antimikroba maka semakin luas daerah zona hambatannya .

2. Metode dilusi

Pada metode ini yang biasa disebutkan dengan turbidimetri atau tabung, menggunakan pengenceran secara seri dari antimikroba dalam media broth dengan konsentrasi yang berbeda-beda, kemudian ditanami dengan mikroba uji pada konsentrasi tertentu.

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan yaitu, dilusi pembenihan cair dan dilusi agar bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara Kuantitatif. Antimikroba dilarutkan dalam media agar atau kaldu, yang kemudian ditanami bakteri yang akan diuji. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut kadar hambat minimum (KHM). Nilai KHM dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapat di serum dan cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respon klinik.

a. Dilusi Cair

Metode dilusi cair mengukur nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) (Pratiwi, 2008). Tiap konsentrasi antimikroba ditambah suspensi bakteri. Keuntungan dilusi cair dapat menentukan kadar hambat minimum dan kadar bunuh maksimum secara jelas. Kerugiannya hanya dapat menguji satu mikroba uji dalam setiap cawan petri atau tabung (Pelczar and Chan, 2006).

b. Dilusi Padat

Metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa jenis mikroba. Kerugian metode ini sulit membedakan antara aktivitas penghambat (KHM) atau mematikan mikroba uji (KBM) (Pratiwi, 2008).

D. Uji Toksisitas

Toksisitas adalah efek berbahaya dari bahan kimia atau suatu obat pada organ target. Dimana pengujian toksisitas biasanya dengan menggunakan hewan uji. Salah satu hewan uji yang sesuai adalah *Brine shrimp* (udang laut) *A. salina* Leach, sejenis udang-udangan primitif dan pertama kali ditemukan di Lymington, Inggris pada tahun 1755 dan termasuk family crustaceae tingkat rendah dari phylum arthropoda. *Brine shrimp* Lethality Test (BSLT) adalah salah satu metode skrining untuk menentukan sifat toksik suatu senyawa atau ekstrak secara akut dengan menggunakan menggunakan hewan coba *Artemia salina*.



Gambar 4. larva *Artemia salina*
Sumber: Google

Bromelin merupakan enzim proteolitik yang berasal dari tanaman Nanas (*Ananas comusus*) dan berfungsi sebagai antikanker. Uji toksisitas merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui ketoksikan suatu senyawa yang umumnya menggunakan metode BSLT. Metode BSLT ini sering digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan, karena relatif murah, cepat, mudah, dan hasilnya dapat dipercaya, serta merupakan praskrining untuk obat antikanker (Fitriyasti and Salmi, 2021).

Hewan uji yang digunakan dalam metode BSLT ini adalah *Artemia salina* Leach atau *Brine shrimp* merupakan zooplankton dan tergolong udang primitif. Nama *Arthemia* diberikan untuk pertama kali oleh Schlosser yang menemukannya disuatu danau asin pada tahun 1755. Kemudian oleh Linnaeus (1758) melengkapi jasad renik ini menjadi *Artemia salina*. Klasifikasi Filum : Arthropoda, Kelas : Crustaceae, Sub Kelas : Branchiopoda, Bangsa : Anostraca, Suku : Artemida Marga : *Artemia* Jenis : *Artemia salina* Leach (Jonathan, *et al.*, 2020).

Artemia dijualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini apabila dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter berkisar antara 200-350 mikron. Satu gram kista *Artemia* kering rata-rata terdiri atas 200.000-300.000 butir kista. Kista yang berkualitas baik akan menetas antara 18-24 jam apabila diinkubasikan dalam air bersalinitas 5-70 permil