

Efek toksisitas ekstrak bromelin buah nanas (*Ananas comosus* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Toxicity effect of bromelain extract from pinenapple fruit (*Ananas comosus* L.) with *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method

Betty Fitriyasti¹⁾, Salmi²⁾*

1) Prodi Pendidikan Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Baiturrahmah, Indonesia

2) Prodi Biologi, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung, Indonesia

*Corresponding author: namiesalmi@gmail.com

ABSTRAK

Bromelin merupakan enzim proteolitik yang berasal dari tanaman nanas (*Ananas comosus* L.) dan berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas ekstrak kasar bromelin buah nanas (*Ananas comosus* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Ekstrak kasar bromelin diperoleh dengan penambahan buffer natrium asetat pH 6,5 pada buah nanas dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm. Toksisitas bromelin ditentukan dengan menginkubasi 15 ekor larva *Artemia salina* Leach berusia 48 jam dalam larutan ekstrak bromelin buah nanas dengan berbagai konsentrasi yaitu 3000 ppm, 2000 ppm, 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm dan 0 ppm selama 24jam. Persentase mortalitas larva dan nilai LC₅₀ dihitung setelah masa inkubasi berakhir. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan persentase mortalitas larva seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak bromelin. Nilai LC₅₀ ekstrak bromelin yang diperoleh yaitu sebesar 9.000 ppm. Nilai LC₅₀ ini > 1000 ppm yang menunjukkan bahwa ekstrak bromelin buah nanas yang diisolasi pada penelitian ini memiliki toksisitas yang rendah. Berdasarkan penelitian ini, ekstrak kasar bromelin buah nanas tidak berpotensi sebagai anti-kanker.

Kata Kunci: Bromelin, buah nanas, LC₅₀, toksisitas.

ABSTRACT

*Bromelain is proteolytic enzyme extracted from pineapple (*Ananas comosus* L.) and potents as anticancer. The aimed of this study was to determined the toxicity effect of bromelain extract from pineapple fruit (*Ananas comosus* L) with brine shrimp lethality test (BSLT) methods. Crude extract of bromelain was obtained by addition of natrium acetat buffer pH 6.5 to pineapple fruit and was setrifugated with 3500 rpm of speed. Bromelain toxicicy was determined by incubated 15 artemia salina Leach (48 aged old) in various concentration of bromelain extract; 3.000 ppm, 2.000 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm and 0 ppm for 24 hours. At the end of incubation period, mortality percentages and LC₅₀ were calculated. The result shown that there were increased in mortality percentage as bromelain concentration increased. LC₅₀ value of bromelain extract was 9.000 ppm. This value indicated that bromelain extract from pineapple fruit had low toxicity effect since its LC₅₀ value were under 1000 ppm. Inconclusion, crude bromelain extract from pineapple fruit did not show anticancer potential based on this study.*

Keywords: Bromelain, LC50, pineapple fruit, toxicity.

PENDAHULUAN

Buah nanas (*Ananas comosus* L.) adalah buah yang dapat dimakan dari famili Bromeliaceae. Tumbuhan ini tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia, Filipina, Thailand, Kenya, India dan Cina. Bagian buah dan bagian lain dari nanas telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam pengobatan tradisional secara empiris. Hal ini berkaitan dengan kandungan bromelin yang terdapat pada berbagai bagian tumbuhan nanas (Mamo dan Assefa, 2019).

Bromelin merupakan ekstrak kasar dari nanas yang mengandung berbagai komponen yang sangat mirip dengan proteinase. Bromelain mengandung berbagai endopeptidase thiol, glukosidase, peroksidase, selulase, glikoprotein, karbohidrat dan beberapa inhibitor protease (Bhattacharyya, 2008). Bromelin disusun oleh 212 asam amino dengan berat molekul 33kDa. Enzim ini stabil pada pH 3.0 – 6.5 dan rentang suhu 40°C – 65°C dengan suhu optimal 50°C – 60°C (Gautam, et al., 2010). Bromelin dapat diserap dalam jumlah besar dan masih memiliki aktivitas proteolitik ketika berada dalam plasma darah. Enzim ini terdeteksi berkaitan dengan alfa 2-makroglobulin dan alfa 1-antikhimotripsin ketika berada dalam plasma (Shiew, et al., 2010). Pemanfaatan bromelin dalam berbagai pengobatan menjadi lebih menjanjikan dengan adanya temuan ini salah satunya dalam terapi enzim pada kanker.

Chang, et al., (2019) melaporkan bahwa bromelain mampu menghambat pertumbuhan kultur sel kanker kolon dan tumor pada hewan model zebrafish dan tikus. Bromelin menginduksi produksi reaktif oksigen spesies (ROS), superoksida, pembentukan autofagosom dan lisosom dan menginduksi apoptosis. Pada kultur sel kanker lambung, perlakuan bromelin menghambat proliferasi. Enzim ini juga mempengaruhi ekspresi protein apoptosis dan antiapoptosis, seperti protein pada sistem

caspase, PARP, p53, sitokrom C, Bcl2 dan MUCI (Amini, et al., 2013).

Senyawa yang berpotensi sebagai anti-kanker identik dengan toksisitasnya yang tinggi. Adanya pengujian toksisitas diperlukan untuk menjamin keamanannya jika dikonsumsi masyarakat. Potensi toksisitas suatu senyawa ini dapat dimonitor dengan menentukan nilai LC₅₀-nya (Astuti, et al., 2005). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi efek totoksik dari buah nanas (*Ananas comosus* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach (*A.salina* L.).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan design quasi experimental dengan *post-test only group design*. Penelitian dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah Padang. Sampel penelitian adalah larva *Artemia salina* L. yang berumur 48 jam dan aktif bergerak.

Ekstraksi bromelin dari buah nanas (*Ananas comosus* L) (Gautam, et al., 2010)

Daging buah nanas yang telah dibersihkan kulitnya dihaluskan dengan penambahan buffer natrium asetat pH 6.5 (750:100 (b/v) menggunakan blender. Daging buah yang telah halus selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm. Supernatan dipisahkan dan merupakan ekstrak kasar bromelin yang akan digunakan untuk uji toksisitas.

Penetasan telur *Artemia salina* L

Telur *Artemia salina* L. diletakkan pada wadah dengan sekat berlobang pada bagian tengahnya dan diisi dengan air laut secukupnya. Salah satu sisi wadah ditutupi dengan aluminium foil sedangkan sisi lainnya dibiarkan terbuka. Telur *A. salina* L diletakkan pada sisi wadah yang ditutupi aluminium foil dan dibiarkan menetas. Setelah 48 jam, *A. salina* L yang berenang ke sisi terbuka dan terlihat aktif digunakan untuk uji toksisitas.

Penyiapan larutan uji ekstrak bromelin buah nanas (*Ananas comosus* L.)

Larutan induk dibuat dengan menjampur 6 mL ekstrak kasar bromelin dengan air laut hingga volumenya 100 mL (6000ppm). Larutan induk selanjutnya diencerkan secara bertingkat sehingga diperoleh konsentrasi 4000 ppm, 3.000 ppm, 2.000 ppm dan 1000 ppm.

Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sebanyak 15 ekor *A. salina* L berusia 48 jam dalam 2000 µL dalam wadah uji ditambahi dengan 2000 µL larutan uji ekstrak bromelin. Blanko berisi 15 ekor *A salina* L dalam 2000 µL air laut dan ditambahi dengan 2000 µL air laut. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi. Inkubasi dilakukan selama 24 jam, kemudian persentase mortalitas dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{akumulasi mati}}{\text{akumulasi mati} + \text{akumulasi hidup}} \times 100\%$$

Tabel 1 Persentase mortalitas larva *Artemia Salina* L dalam ekstrak bromelin buah nanas (*Ananas comosus* L.)

Konsentrasi ekstrak (ppm)	Akumulasi mati	Akumulasi hidup	% mortalitas
0	0	45	0
500	1	44	2,22
1.000	2	43	4,44
1.500	3	42	6,67
2.000	5	40	11,11
3.000	8	37	17,78

Isolasi bromelin dapat dilakukan dengan menghancurkan daging buah nanas untuk mendapatkan ekstrak kasar bromelin (Hairi, 2010). Pada penelitian ini buffer natrium asetat pH 6,5 digunakan dalam proses isolasi bromelin. Fajrin (2012) menyebutkan bahwa enzim bromelin memiliki pH optimal 6,5-7. Pada pH ini bromelin berada pada konformasi optimal dan mantap.

Uji toksisitas merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui ketoksikan suatu senyawa dan potensi suatu senyawa sebagai senyawa anti kanker. Pengujian dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah metode umum yang dilakukan dalam uji toksisitas dan

Nilai LC₅₀ ditentukan menggunakan analisis probit menggunakan SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase mortalitas larva *A. salina* L. dalam ekstrak bromelin buah nanas dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 1. Persentase mortalitas meningkat seiring dengan peningkatan ekstrak bromelin buah nanas. Mortalitas tertinggi terdapat pada larutan uji ekstrak buah nanas dengan konsentrasi 3.000 ppm (17,78 %). Tidak ditemukan persentase kematian 50% larva *A. salina* L pada semua konsentrasi ekstrak bromelin buah nanas yang menunjukkan nilai LC₅₀ ekstrak lebih tinggi dari 3.000 rpm. Hasil analisis probit menggunakan SPSS ditemukan nilai LC₅₀ ekstrak bromelin buah nanas adalah 9.000 ppm.

memiliki korelasi dengan aktivitas anti-kanker. Uji ini menggunakan larva *Artemia salina* L. yang berumur 48 jam sebagai hewan uji ((Mayer et al., 1982; Harmita dan Radji, 2008).

Potensi senyawa sebagai anti kanker ditentukan oleh nilai LC₅₀-nya. Nilai LC₅₀ merupakan konsentrasi suatu ekstrak yang menyebabkan kematian 50% hewan uji. Mayer et al., (1982), menyebutkan bahwa suatu senyawa memiliki potensi sebagai anti-kanker jika memiliki nilai LC₅₀ < 1000 ppm. Apabila nilai LC₅₀ menggunakan metode BSLT menunjukkan sifat toksik suatu ekstrak, maka dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker (Carballo, 2002). Hasil penentuan nilai LC₅₀

ekstrak bromelin buah nanas diperoleh nilai lebih tinggi dari 1000 ppm yaitu sebesar 9.000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar bromelin memiliki toksisitas yang rendah dan tidak berpotensi sebagai senyawa anti-kanker.

Nilai toksisitas ekstrak bromelin yang rendah ini diduga dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti tua-mudanya buah nanas, konsentrasi enzim bromelin yang terisolasi serta aktivitas enzim bromelin. Hairi (2010), menyebutkan bahwa buah nanas muda mengandung enzim bromelin yang lebih banyak dibandingkan nanas tua. Nilai toksisitas ekstrak bromelin pada penelitian ini juga lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Khuluq, et al., (2017) yang memperoleh nilai LC_{50} sebesar 2.204,45 ppm. Hal ini diduga karena adanya perbedaan daerah tumbuh nanas yang digunakan dan metode ekstraksi. Perbedaan parameter suhu, ketinggian dari permukaan laut, kelembapan serta kandungan unsur hara daerah tumbuh akan sangat mempengaruhi pertumbuhan nanas, yang secara tidak langsung mempengaruhi kandungan senyawa dalam buahnya.

Penelitian ini hanya menggunakan ekstrak kasar dari buah nanas dengan metode yang sederhana. Adanya optimasi pada metode ekstraksi akan pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat memperoleh ekstrak yang lebih murni.

KESIMPULAN

Persentase mortalitas larva *Artemia salina* L. tertinggi terdapat pada ekstrak bromelin buah nanas dengan konsentrasi 3.000 ppm. Nilai LC_{50} ekstrak bromelin buah nanas yaitu 9.000 ppm yang menunjukkan bahwa ekstrak bromelin buah nanas tidak berpotensi sebagai senyawa anti-kanker ($LC_{50} < 1.000$ ppm).

DAFTAR PUSTAKA

Amini, A., Ehteda, A., Masoumi, S., Moghaddam, Akhter, J., Pillai, K., Morris, D.L. (2013). Cytotoxic effect of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III,

HT29-5FI2, and HT29-5M2I). *OncoTargets and Therapy*, 6, 403-409

Astuti, P., Alam, G., Hartanti, M.S., Sari, D., Wahyuono, S. (2005). Uji sitotoksik senyawa alkaloid dadri *Sponos petrosia* sp; potential pengembangan sebagai antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia*, 16(1), 58-62

Bhattacharyya, B.K. (2008). Bromelain: an overview. *Nat. Prod. Radiance*, 7(4), 359-363

Chang, T.C., Wei, P.L., Makondi, P.T., Chen, W.T., Huang, C.Y., & Chang, Y.J. 2019. Bromelain inhibits the ability of colorectal cancer cell to proliferate via activation of ROS production and autophagy. *PLoS ONE*, 14(1), e0210274.

Carballo, J.L., Inda, Z.L.H., Perez. (2002). A Comparison between two brine shrimp assay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural product. *BMC Biotechnol.*, 2(17), 1-5

Fajrin, E. (2012). Penggunaan Enzim Bromelin pada Pembuatan Minyak Kelapa (*Cocos nucifera*) secara Enzimatis. [skripsi]. Makassar: Universitas Hasanuddin.

Gautam, S.S., Mishra, S., Dash, V., Amit, K. and Rath, G. (2010). Cooperative study or extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai J. Pharm. Sci.*, 34 (1), 67-76.

Hairi, M. (2010). Pengaruh Umur Buah Nanas dan Konsentrasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin pada Pembuatan Virgin Coconut Oil dari Buah Kelapa Typical (*Cocus nucifera* L.).[skripsi]. Malang; Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Harmita, dan Radji, M. (2008). *Analisis Hayati*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.

Khuluq, M.N.N.H, Wardatun S, Wiendarlina, I.Y. (2017.) Uji toksisitas sari buah dan bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach). *E-jurnal unpak*.

<http://perpustakaan.fmipa.unpak.ac.id/file/ejurnal%20much%20066111161.pdf>

Mayer, B.N., Ferigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., (1982). Brine Shimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Plant Medica*, 45, 31-34

Shiew, P.S., Fang, Y.L. & Majid, F.A.A. 2010. *In vitro study of bromelain activity*

inartificial stomach juice and blood.

Paper presented at the 3rd Internasional Conference on Biotechnology for the Wellness Industry, PWTC Kuala Lumpur.

Mamo, J. & Assefa, F. 2019. Antibacterial and anticancer property of bromelain: a plant protease enzyme from pineapples (*Ananas comosus*). *Curr. Trends Biomedical Eng & Biosci*, 19(2), 0060-0068.