

Uji Aktivitas Trombolitik dan Antikoagulan Enzim Bromelin Batang Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr)

Shakina Noviradevi¹, Ahyana Fitrian¹, Nurul Marfu'ah¹, Indah Tri Lestari¹, Nadia Iha Fatihah¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Darussalam Gontor, Ponorogo, Indonesia

✉ shakinanovira15@gmail.com

Article info:

Submitted : 01-4-2026

Revised : 15-4-2026

Accepted : 29-4-2026



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Publisher:

PC IAI Sragen

ABSTRAK

Tubuh memiliki respon normal dan spontan untuk menghentikan darah ketika terjadi cedera. Tetapi, apabila tubuh memiliki respon yang berlebih akan mengakibatkan resiko gangguan koagulasi. Proses koagulasi yang dikendalikan dengan baik dapat menurunkan potensi gangguan. Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) memiliki kemampuan sebagai trombolitik dan antikoagulan karena memiliki enzim bromelin. Penelitian ini merupakan *true eksperimental* dengan pengujian konsentrasi enzim bromelin batang nanas yaitu 20, 40, 80, dan 100 µL untuk uji aktivitas trombolitik serta konsentrasi 40, 80, 160 dan 200 µL untuk uji antikoagulan pada darah manusia. Uji aktivitas trombolitik menggunakan metode % *Clot Lysis* untuk melihat darah yang lisis setelah perlakuan. Uji antikoagulan menggunakan metode Lee White untuk melihat *Clotting Time* yang diikuti metode eustrek untuk visualisasi darah dalam skala mikroskop. Analisis data menggunakan *One-Way ANOVA* dengan SPSS 16.0 dan taraf signifikansi 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim bromelin hasil presipitasi menggunakan ammonium sulfat 60% dari batang nanas memiliki kadar protein sebesar 9,093 µg/ml dan aktivitas enzimnya sebesar 0,581 U/ml. Enzim bromelin batang nanas memiliki aktivitas trombolitik ($p < 0,05$) dengan konsentrasi enzim bromelin sebanyak 100 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas trombolitik. Enzim bromelin batang nanas memiliki aktivitas antikoagulan ($p < 0,05$) dengan konsentrasi enzim bromelin sebanyak 160 µl (P3) dan 200 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas koagulan.

Kata Kunci: antikoagulan; enzim bromelin; nanas; trombolitik

1. PENDAHULUAN

Hemostasis merupakan proses untuk menghentikan darah secara spontan pada pembuluh darah yang terkena cedera. Hal ini merupakan respon normal yang dilakukan tubuh untuk menghentikan perdarahan pada lokasi yang mengalami cedera. Akan tetapi, apabila hemostasis dalam darah berlebihan, maka akan menyebabkan resiko gangguan koagulasi yang meliputi trombosis dan emboli. Trombosis terjadi karena adanya suatu *thrombus* atau bekuan darah didalam pembuluh. Sedangkan emboli merupakan penyempitan arteri karena adanya *embolus* yang menyumbat (Tjay and Rahardja, 2015). Obat antitrombotika diperlukan untuk mengendalikan proses koagulasi yang bekerja dengan menurunkan aktivitas pembekuan darah untuk mencegah terbentuknya thrombus dan menghancurkannya (Gunawan et al., 2016).

Heparin merupakan obat antikoagulan dengan mekanisme kerjanya berikatan dengan AT-III sehingga menghambat protease sebagai faktor pembekuan darah. Heparin juga menginaktivkan faktor IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, dan XIIIa [1]. Heparin berasal dari jaringan hewan, maka dapat memicu alergi pada pasien tertentu. Hipersensitivitas yang ditimbulkan dari heparin adalah menggigil, demam, urtikaria, atau syok anafilaksis. Sedangkan pada pengguna jangka panjang dapat menimbulkan mialgia, nyeri tulang, trombositopenia dan osteoporosis (Rohmah and Fickri, 2020).

Nattokinase merupakan obat trombolitik yang diproduksi dari *Bacillus subtilis* selama proses fermentasi kedelai yang manfaatnya dapat menghancurkan thrombus dan mencegah terjadinya penggumpalan darah (Guo et al., 2019). Mekanisme nattokinase yang meningkatkan pelepasan *Tissue Plasminogen Activator* (tPA) dengan inaktivasi *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (PAI-1) (Chen et al., 2018). Nattokinase juga dapat mengubah prourokinase endogen menjadi urokinase (uPA) [6]. Nattokinase memiliki efek samping perdarahan dan memicu alergi karena merupakan obat modifikasi dari kedelai (Rohmah and Fickri, 2020). Berdasarkan efek samping yang ditimbulkan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas antikoagulan dan trombolitik dari bahan lain misalnya dari alam.

Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) merupakan tanaman asli Brazil yang banyak dibudidayakan di daerah tropis dan subtropis, salah satunya Indonesia. Pada tahun 2015 Indonesia merupakan produsen nanas terbesar ketiga setelah Filipina dan Thailand untuk wilayah ASEAN dengan kontribusi sekitar 23% (Kementan, 2016). Buah nanas yang matang mengandung 14% gula, enzim protease yaitu bromelin, dan sejumlah asam sitrat, asam maleat, vitamin A dan B. Asam sitrat merupakan asam organik yang paling melimpah pada buah nanas. Nanas mengandung 81,2 hingga 86,2% air dan 13-19% total padatan diantaranya berupa sukrosa, glukosa dan fruktosa yang merupakan komponen utama. Hampir 85% dari total padatan berupa karbohidrat dan sebanyak 0,1% berupa lipid dan senyawa nitrogen. Sebanyak 20-30% senyawa nitrogen yang terkandung dalam nanas merupakan protein murni dengan 80% memiliki aktivitas proteolitik yang dikenal sebagai enzim bromelin (Farid Hossain et al., 2015).

Enzim bromelin merupakan enzim protease sulfhidril (-SH) yang dapat menghidrolisis ikatan peptida menjadi asam amino yang lebih sederhana. Kandungan bromelin pada batang nanas adalah golongan sistein proteinase dengan jumlah asam amino sebanyak 212 (Bhakuni and Venkatesu, 2019). Dengan berat molekulnya adalah 24,5 kDa dengan nilai pI 9,55 dan koefisien difusi $7,77 \times 10^{-7}$ cm²/s. Bromelin pada batang nanas memiliki empat hexosamine, dan 2,1 % karbohidrat. Manosa, fuktosa, xilosa, dan glukosamin dengan rasio perbandingan 3:1:1:4 merupakan komposisi yang terkandung dalam bromelin batang nanas (Arshad et al., 2014). Oleh karena itu, bromelin merupakan golongan glikoprotein. Batang dan buah nanas memiliki kandungan bromelin yang lebih besar dari bagian nanas lainnya. Batang nanas memiliki kandungan bromelin terbesar dan sering digunakan secara luas dalam industri (Ramli et al., 2016).

Enzim bromelin memiliki keunggulan dalam pengobatan, seperti anti inflamasi dan analgesic (Agostinis et al., 2015) (Muhammad and Ahmad, 2017), membersihkan karies gigi (Alfiyanti et al., 2019), osteoarthritis (Pavan et al., 2012), antihelminthes (Khan et al., 2012), antitumor (Mohamad et al., 2019), antikanker (Amini et al., 2014), potensi antibiotik, immunomodulator, antirematik, dan berperan dalam koagulasi dan *fibrinolysis* pada darah (Chakraborty et al., 2021). Bromelin tidak hanya unggul dalam bidang pengobatan saja, tetapi memiliki manfaat juga dalam bidang industri seperti dapat mengempukkan daging (Hage et al., 2012), antibrowning agent (Sarkar et al., 2017) dan pengawet jus jeruk (Anjos et al., 2016). Ekstrak buah nanas merupakan antikoagulan yang baik karena berhasil menghambat pembekuan darah selama tiga jam secara invitro (Catalan et al., 2014). Tidak hanya itu, enzim bromelin juga memiliki aktivitas fibrinolitik yang lebih tinggi daripada *Pseudananas macrodotes*, *Bromelia balansae*, dan *Bromelia hieronymi* (Errasti et al., 2016).

Presipitasi merupakan cara yang biasa digunakan dalam pemurnian enzim skala besar. Proses ini merupakan tahapan awal untuk mendapatkan bromelin yang murni. Proses ini memanfaatkan prinsip kerja pengendapan protein menggunakan garam, pelarut organik, polimer non ionik, logam, atau dengan mengubah pH (Novaes et al., 2015). Ethanol, ketone, methanol, propanol, dan jenis alkohol lainnya merupakan pelarut organik yang digunakan dalam proses presipitasi. Golongan garam yang sering digunakan dalam proses presipitasi adalah ammonium sulfat. Presipitasi yang berasal dari bonggol nanas dengan kejenuhan ammonium sulfat 50-80%

memiliki kandungan protein dengan kandungan aktivitas enzim bromelin paling tinggi (Ilyas et al., 2020). Aktivitas bromelin yang diisolasi dari batang lebih tinggi daripada bagian nanas yang lain hingga mencapai 3,500 GDU/gram, sedangkan pada buah nanasnya menghasilkan 1,500 GDU/gram (Nurhidayah et al., 2013).

Enzim bromelin bisa didapatkan dari semua bagian tumbuhan nanas dengan presentase bromelin pada buah utuh masak (0,060-0,080), daging nanas (0,080-0,125), kulit (0,050-0,075), tangkai (0,040-0,060), batang (0,100-0,600) (P et al., 2011). Dilihat dari presentase bromelin dari bagian tumbuhan nanas, batang merupakan bagian dengan presentase terbesar. Oleh karena itu diharapkan memiliki aktivitas antikoagulan dan trombolitik yang lebih baik dibandingkan bagian lainnya. Akan tetapi, belum dilakukan penelitian aktivitas antikoagulan dan trombolitik bromelin yang didapatkan dari batang nanas (*Ananas comosus* (L) Merr). Berdasarkan latar belakang diatas, maka perlu dilakukan riset terkait hal tersebut.

2. METODE

Ekstraksi Enzim Bromelin

Buah nanas yang sudah matang, kemudian dipisahkan bagian batangnya dari bagian daun dan buahnya. Batang nanas kemudian dicuci dengan aquades dan dipotong kecil-kecil. Setelah itu ditimbang sebanyak 1.500 gram dan diblender dengan ditambahkan buffer sodium asetat pH 6,5 sebanyak 200 ml kemudian disaring. Filtrat hasil saringan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatan dan disimpan dalam suhu 4°C (Nurhayati et al., 2018).

Presipitasi

Ekstrak enzim kasar akan diisolasi melalui pengendapan bertingkat menggunakan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan interval 60%. Larutan ekstrak enzim kasar sebanyak 3 ml dimasukkan kedalam gelas beaker. Secara perlahan ditambahkan garam amonium sulfat dengan interval yang telah ditentukan masing-masing sebanyak 7 ml sambil diaduk menggunakan magnetic stirer dengan kecepatan 3.500 rpm selama 45 menit dan dibiarkan mengendap semalaman dalam lemari pendingin. Ekstrak kasar disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit kemudian diambil peletnya dan disimpan dalam suhu 4°C (Nurhayati et al., 2018).

Dialisis

Kantong selofan diaktifkan dengan dipanaskan dalam equilibrium buffer selama 10 menit lalu dicuci menggunakan aquadest. Endapan hasil presipitasi dimasukkan kedalam kantong selofan dan diikat pada bagian ujungnya. Kantong yang berisi enzim di dialisis dengan larutan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dengan suhu 4 °C yang berada diluar kantong selofan sambil diaduk menggunakan magnetic stirer dengan kecepatan 300 rpm (Rachmania et al., 2017).

Uji Kadar Protein

Metode pengujian yang digunakan dalam uji kadar protein adalah Bradford. Prosedur pengujian dilakukan dengan cara memasukkan 30 µL larutan sampel bromelin kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest 970 µL dan 2 ml reagen Bradford. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 10-15 menit, lalu diukur absorbansinya pada 586 nm. Penentuan kadar protein dilakukan dengan membandingkan absorbansi bromelin dengan persamaan linear kurva standar larutan *Bovine Serum Albumin* (Nurhidayah et al., 2013).

Uji Aktivitas Enzim

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim bromelin adalah metode Murachi menggunakan substrat kasein. Substrat kasein 2% sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan enzim bromelin sebanyak 30 µl. Ditambahkan buffer fosfat pH 7,4 sebanyak 970 µl dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Ditambahkan TCA 5% sebanyak 1 ml dan dipanaskan selama 30 menit dengan suhu 40°C. Disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Aktivitas protease diukur berdasarkan kadar tirosin yang terbaca dalam panjang gelombang menggunakan rumus di bawah ini (Nurhidayah et al., 2013).

$$\text{Pengukuran Aktivitas Enzim per ml} = \frac{\text{Berat tirosin per ml} \times V \text{ larutan uji}}{Mr \text{ tirosin} \times \text{waktu inkubasi} \times V \text{ ekstrak enzim}}$$

Pengambilan Sampel Darah Manusia

Proses pengambilan sampel darah manusia dilakukan atas persetujuan etik yang diajukan kepada Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta (UMS) dengan no. 3830/B.2/KEPK-FKUMS/XI/2021. Kriteria inklusi subyek uji adalah perempuan dengan rentang umur 18-25 tahun, BMI antara 18,5-24,9 kg/m², dan tekanan darah normal. Kriteria eksklusi meliputi mengkonsumsi obat antitrombotika, NSAID, antibiotic β -Laktam, vitamin E, Vitamin K dan suplemen dengan antioksidan tinggi selama dua minggu terakhir sebelum pengambilan darah (Nurhidayah et al., 2013).

Uji Aktivitas Trombolitik

Pengujian aktivitas trombolitik dilakukan dengan mengukur %Clot lysis. Tabung mikrosentrifus yang telah diisi darah sebanyak 500 μ L diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah terbentuk bekuan darah, serum dihilangkan dengan cara dipipet pada tabung mikrosentrifus agar tidak merusak bekuan darah. Bekuan darah ditimbang beratnya dan kemudian diberi perlakuan. Terdapat 5 perlakuan yang meliputi kontrol positif, kontrol negative, bromelin konsentrasi 20, 40, 80, dan 100 μ L. Setiap tabung diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati lisis bekuan darah selama 90 menit. Tabung mikrosentrifus ditimbang kembali setelah semua darah yang lisis sudah tidak tertinggal didalamnya. Penurunan berat bekuan darah dihitung presentasi lisisnya menggunakan rumus berikut ini (Nurhidayah et al., 2013).

$$\% \text{ Lisis Bekuan Darah} = \frac{\text{berat clot awal} - \text{berat clot yang tidak lisis}}{\text{berat clot awal}} \times 100\%$$

Uji Aktivitas Antikoagulan

Pengujian aktivitas antikoagulan dilakukan dengan mengukur waktu yang dibutuhkan darah untuk koagulasi. Prosedur yang digunakan dengan mengamati waktu pembekuan darah (*clotting time*) dengan metode *Lee White*. Terdapat 6 perlakuan yang meliputi kontrol positif, kontrol negative, kontrol darah, bromelin konsentrasi 40, 80, 160, dan 200 μ L. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan cara mengalirkan darah 1 ml dan saat itulah stopwatch dijalankan. Setelah 1 menit, tabung diangkat dan masing-masing dimiringkan dengan kemiringan 45° untuk melihat reaksi pembekuan sudah terjadi atau belum. Apabila belum terjadi pembekuan, maka diletakkan kembali dan dilakukan pengamatan setiap 1, 3, 5, 10, dan 15 menit. Penilaian *clotting time* dilakukan dengan memberikan rentangan nilai yaitu, angka 1 untuk menilai darah yang masih cair, angka 2 untuk penilaian darah yang kental, angka 3 untuk menilai darah yang sangat kental, dan angka 4 untuk darah yang membeku. Visualisasi pembekuan darah dilihat menggunakan metode Apusan Darah (Eustrek) untuk melihat efek pembekuan darah secara mikroskopik dengan mikroskop perbesaran 40x (Nurhidayah et al., 2013).

Analisis Data

Data hasil uji aktivitas trombolitik dan antikoagulan diuji normalitasnya dengan metode Shapiro Wilk. Nilai signifikansi menunjukkan $p > 0,05$ yang artinya bahwa data terdistribusi normal sehingga analisis dilanjutkan dengan uji parametric One Way ANOVA (Analysis of Variance) dan uji *pos hoc* LSD (Least Significant Differrent). Program statistik yang digunakan adalah SPSS 16.0 dengan taraf signifikansi 5%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kadar Protein dan Aktivitas Enzim Bromelin

Penentuan kadar protein dan aktivitas enzim bromelin dilakukan untuk mengetahui adanya enzim bromelin setelah proses isolasi. Dalam penelitian ini presipitasi dilakukan menggunakan ammonium sulfat untuk memisahkan pengotor dengan ekstrak kasar enzim. Senyawa ini digunakan karena sifatnya yang tidak merusak struktur protein (Rachmania et al., 2017). Tidak hanya itu, ammonium sulfat dipilih karena efektif dan harganya yang terjangkau. Hasil screening kuantitatif enzim bromelin dari isolasi menggunakan ammonium sulfat 60% dalam 30 μ L pelarut terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar Protein, Aktivitas Enzim, dan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin Ekstrak Bonggol Nanas

Kadar Protein	Aktivitas Enzim	Aktivitas Spesifik
9,093 μ g/ml	0,581 U/ml	1,022 U/ μ g

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalis dalam tubuh makhluk hidup. Beberapa enzim tidak membutuhkan gugus lainnya untuk aktivitasnya selain residu asam aminonya. Sedangkan beberapa enzim lainnya memerlukan komponen senyawa tambahan yaitu cofactor dan koenzim. Kofaktor terdiri atas ion anorganik misalnya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} atau Zn^{2+} . Sedangkan koenzim biasanya berupa molekul organik kompleks atau molekul metalorganik. Koenzim berfungsi sebagai pembawa sementara gugus spesifik atau electron. Kebanyak koenzim diturunkan dari vitamin (Azhar, 2016).

Penentuan kadar protein pada penelitian ini dilakukan dengan metode Bradford yaitu melakukan pengukuran konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam sebuah larutan yang melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Pewarna ini menghasilkan warna kebiruan karena berikatan dengan protein dalam larutan asam (Nurhidayah et al., 2013). Gugus sulfonat terionisasi mengalami interaksi elektrostatis dengan gugus fungsi protein yang bermuatan positif (Compton and Jones, 1985). Panjang gelombang yang digunakan adalah 586 nm. Apabila warna yang diamati (komplementernya) berwarna biru, dengan warna yang diserap adalah kuning maka panjang gelombangnya adalah 580 - 595 nm (Gandjar and Rohman, 2007). Uji Kadar protein sampel didapatkan dari hasil persamaan regresi linear dari standar BSA. Hasil kadar protein pada penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Dewi, dkk. yaitu dengan kadar protein sebesar 2,858 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dikarenakan bagian nanas yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian bonggolnya sedangkan pada penelitian Dewi, dkk. menggunakan bagian buahnya. Kadar enzim bromelin pada setiap bagian tumbuhan nanas berbeda-beda (P et al., 2011). Selain itu, larutan yang digunakan untuk isolasi juga berbeda. Pada penelitian ini menggunakan ammonium sulfat, sedangkan pada penelitian Dewi, dkk. menggunakan garam dapur 40% (Nurhayati et al., 2020). Bahan yang digunakan untuk presipitasi dapat mempengaruhi perolehan protein dan kemampuan aktivitas proteasenya.

Aktivitas enzim bromelin diukur dari kemampuan enzim dalam memecah protein kasein menjadi asam amino tirosin. Aktivitas enzim diukur dalam satuan unit (U) yaitu jumlah enzim yang mengkatalisis 1 mikromol substrat per menit dalam kondisi tertentu. Pada penelitian ini uji aktivitas enzimatis dilakukan pada pH 7 dengan waktu inkubasi 30 menit dalam suhu 37°C. Pemilihan pH ini dilakukan atas dasar bahwa aktivitas enzimatis bromelin memiliki spectrum yang luas dengan rentangan pH dari 5,5 sampai 8,0 (Pavan et al., 2012). Reaksi enzim-substrat menghasilkan produk peptide yang larut dan stabil, sehingga untuk menghentikan reaksi ditambahkan trikloroasetat diiringi dengan pemanasan pada suhu 40 °C selama 30 menit. Trikloroasetat bersifat asam jika enzim direaksikan dengan asam kuat, maka rantai polipeptida akan terpotong, sehingga terjadi konformasi struktur yang dapat menyebabkan aktivitas katalitik enzim hilang. Suhu tinggi menyebabkan ikatan enzim terputus dan denaturasi (Fathimah and Wardani, 2014).

Aktivitas enzim bromelin diukur dari hasil persamaan regresi linear pada standar tirosin dalam panjang gelombang 274 nm. Tirosin dapat terbaca pada spektrofotometer UV karena memiliki ikatan diena terkonjugasi pada strukturnya. Hasil aktivitas enzim pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurhidayah, dkk. dengan aktivitas enzim batang nanas sebesar 1,020 U/gram (Nurhidayah et al., 2013). Perbedaan yang ada diakibatkan karena aktivitas enzim dipengaruhi oleh kondisi lingkungan terutama pH dan sifat dari protein pada enzim itu sendiri (Rachmawati et al., 2015). Tidak hanya itu, enzim memiliki faktor yang dapat mempengaruhi kinerjanya seperti konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, inhibitor dan pH (Poedjiadi and Supiyanti, 2009).

Aktivitas spesifik enzim menggambarkan kemurnian suatu enzim. Aktivitas spesifik dihitung dari jumlah unit aktivitas enzim permiligram protein [38]. Semakin tinggi nilai aktivitas spesifik enzim, maka semakin tinggi tingkat kemurnian enzim tersebut. Tingkat kemurnian enzim ini dipengaruhi oleh hilangnya protein non enzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui bahan dalam proses pemurnian enzim (Purba et al., 2020).

Uji Aktivitas Trombolitik

Uji aktivitas trombolitik dari enzim bromelin batang nanas dilakukan dengan metode *blood clot assay* menggunakan bekuan darah. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah penurunan berat bekuan darah yang dihitung pada menit ke 90 dibandingkan dengan sebelum dan setelah perlakuan. Semakin kecil berat bekuan yang tersisa, maka aktivitas trombolitik semakin tinggi. Hasil rata-rata % *Clot lysis* terdapat pada diagram 1.

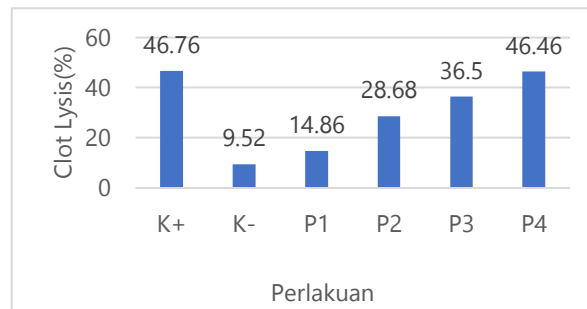


Diagram 1. Rata-rata % *Clot lysis*

Keterangan: K+ (Kontrol positif), K- (Kontrol negative), P1 (Bromelin 20 µl), P2 (Bromelin 40 µl), P3 (Bromelin 80 µl), P4 (Bromelin 100 µl)

Kontrol positif pada uji aktivitas trombolitik di penelitian ini menggunakan obat nattokinase. Obat ini digunakan karena memiliki aktivitas trombolitik yang mirip dengan enzim bromelin. Mekanisme kerja nattokinase adalah dengan meningkatkan pelepasan *Tissue Plasminogen Activator* (tPA) dengan inaktivasi *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (PAI-1) (Chen et al., 2018). Nattokinase juga dapat mengubah prourokinase endogen menjadi urokinase (uPA) (Chen et al., 2018)

Data rata-rata % *Clot lysis* pada setiap perlakuan (diagram 1) kemudian dianalisis menggunakan one way ANOVA yang hasilnya menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya signifikan (beda nyata). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi enzim bromelin batang nanas berpengaruh signifikan (nyata) terhadap aktivitas trombolitik. Setelah itu dilanjutkan dengan uji *pos hoc* LSD yang menunjukkan hasil bahwa nilai signifikansi paling rendah terdapat pada P4. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi enzim bromelin sebanyak 100 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas trombolitik.

Enzim bromelin berperan dalam proses trombolitik dengan cara masuk dalam sirkulasi darah dan terikat pada inhibitor proteinase massa molekul tinggi. Hal tersebut menyebabkan aktivasi faktor fibrinolitik dengan meningkatkan konsentrasi plasmin sehingga dapat membatasi proses koagulasi darah dengan mendegradasi fibrin (Maurer, 2001). Secara spesifik, enzim bromelin melakukan aktivitas trombolitik dengan cara meningkatkan transformasi plasminogen menjadi plasmin sehingga secara efektif dapat melakukan proses trombolitik dan pembekuan darah dapat dibatasi (Chakraborty et al., 2021). Plasmin berfungsi sebagai pemecah fibrin sehingga dapat menghambat proses pembekuan darah (Lupita et al., 2015). Enzim bromelin memiliki spektrum substrat yang luas, meliputi fibrin, albumin, kasein, angiotensin II, dan bradykinin (Pang et al., 2020).

Uji Aktivitas Antikoagulan

Uji aktivitas antikoagulan dari enzim bromelin batang nanas dilakukan dengan menghitung *Clotting time* dan diamati dalam skala mikroskopik menggunakan metode apusan darah. Pengamatan mikroskopik aktivitas pembekuan darah diawali dengan meneteskan sampel diatas kaca preparat. Darah dikatakan mengalami pembekuan jika pada sediaan apusan darah terlihat berkelompok, tampak padat, sel-sel darah juga melekat satu sama lain, (Shalehah and Cahaya, 2015) dan trombosit berbentuk bulat serta memiliki inti yang kosong (Anthony L., 2018).

Sampel darah difiksasi menggunakan methanol agar apusan darah dapat menyerap pewarna yang diberikan dengan sempurna. Tidak hanya itu, methanol juga dapat melekatkan apusan darah pada kaca preparat agar tidak mengelupas serta menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah struktur selnya (Warsita et al., 2019). Setelah itu, preparat diwarnai dengan giemsa untuk memudahkan dalam proses pengamatan sel darah. Pewarna giemsa memiliki sifat pewarna kation azure B yang berfungsi untuk mewarnai trombosit dan warna biru ungu pada nucleoprotein, granula basophil, dan granula neutrophil. Selain itu, pewarna giemsa memiliki sifat pewarna anion seperti Eosin Y yang memberikan warna merah atau orange pada eritrosit dan granula eosinophil (Salnus and Arwie, 2020).

Parameter yang diamati pada uji aktivitas antikoagulan dalam penelitian ini adalah meningkatnya *clotting time* pada darah. Semakin lama waktu *clotting time*, maka aktivitas antikoagulan semakin tinggi. Data *clotting time* pada masing-masing kelompok terdapat pada diagram 2.

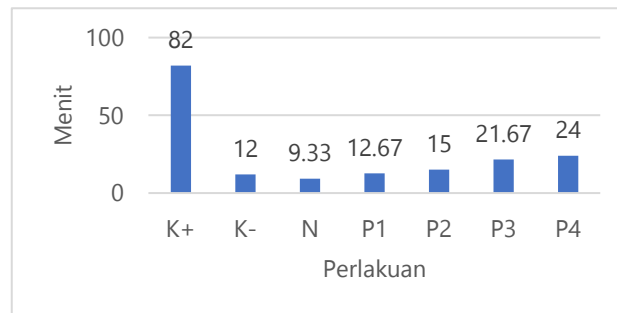


Diagram 2. Rata-rata *Clotting Time*

Keterangan: K+ (Kontrol positif), K- (Kontrol negatif), N (Kontrol darah normal), P1 (Bromelin 40 µl), P2 (Bromelin 80 µl), P3 (Bromelin 160 µl), P4 (Bromelin 200 µl)

Kontrol positif pada uji aktivitas antikoagulan dalam penelitian ini menggunakan heparin karena memiliki aktivitas yang hampir sama dengan enzim bromelin. Heparin merupakan obat antikoagulan dengan mekanisme kerjanya berikatan dengan AT-III sehingga menghambat protease faktor pembekuan darah. Heparin juga menginaktivkan faktor IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, dan XIIIa (Gunawan et al., 2016).

Data rata-rata *clotting time* pada setiap perlakuan (diagram 2) kemudian dianalisis menggunakan one way ANOVA yang hasilnya menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya signifikan (beda nyata). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi enzim bromelin batang nanas berpengaruh signifikan (nyata) terhadap aktivitas antikoagulan. Setelah itu dilanjutkan dengan uji *pos hoc* LSD yang menunjukkan hasil bahwa nilai signifikansi paling rendah terdapat pada P3 dan P4. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi enzim bromelin sebanyak 160 µl (P3) dan 200 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas koagulan.

Enzim bromelin dapat berperan sebagai agen antikoagulan karena berperan dalam mempengaruhi protein koagulasi lainnya. Bromelin juga menurunkan aktivitas kininogen dengan berat molekul tinggi (HMWK) yang berfungsi sebagai protein jangkar protein koagulasi (XIIa, IXa, XIa) di epitel yang rusak dan faktor koagulasi X yang penting dalam pembentukan trombin yang dibutuhkan untuk polimerisasi fibrinogen (Catalan et al., 2014). Bromelin menghambat protrombin time dan activated partial tromboplastin time yang keduanya merupakan jalur intrinsic dan ekstrinsic dalam pembentukan fibrin. Bromelin mencegah adanya formasi dengan berinteraksi dengan faktor pembekuan darah khususnya adalah faktor X dan protrombin sehingga pembentukan fibrin menjadi lambat dan pembekuan darah menjadi lebih lama (Chakraborty et al., 2021).

4. KESIMPULAN

- Enzim bromelin hasil presipitasi menggunakan ammonium sulfat 60% dari batang nanas memiliki kadar protein sebesar 9,093 µg/ml dan aktivitas enzimnya sebesar 0,581 U/ml.
- Enzim bromelin batang nanas memiliki aktivitas trombolitik ($p < 0,05$) dengan konsentrasi enzim bromelin sebanyak 100 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas trombolitik.
- Enzim bromelin batang nanas memiliki aktivitas antikoagulan ($p < 0,05$) dengan konsentrasi enzim bromelin sebanyak 160 µl (P3) dan 200 µl (P4) memberikan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas koagulan.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Agostinis, C., Zorzet, S., De Leo, R., Zauli, G., De Seta, F., Bulla, R., 2015. The Combination of N-Acetyl Cysteine, Alpha-Lipoic Acid, and Bromelain Shows High Anti-Inflammatory Properties in Novel In Vivo and In Vitro Models of Endometriosis. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation.
- Alfiyanti, R.D., Prihatiningrum, B., Budirahardjo, R., 2019. Efek Enzim Bromelin Buah Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Berbasis Sediaan Gel terhadap Lebar Intertubulus Dentin. e-Journal Pustaka Kesehatan 7.
- Amini, A., Masoumi-Moghaddam, S., Ehteda, A., Morris, D.L., 2014. Bromelain and N-acetylcysteine inhibit proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells in vitro:

- significance of combination therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33.
- Anjos, M. dos, Silva, A. da, Pascoli, I. de, Machinski, M., Peralta, R., Filho, B. de A., 2016. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. *Int. J. Food Microbiol* 216.
- Anthony L., M., 2018. Junqueira's Basic Histology, 13th ed. McGraw-Hill Education, New York.
- Arshad, Z.I.M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., Loke, S.P., 2014. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
- Azhar, M., 2016. Biomolekul Sel (Karbohidrat, Protein dan Enzim). UNP Press, Padang.
- Bhakuni, K., Venkatesu, P., 2019. Does macromolecular crowding compatible with enzyme stem bromelain structure and stability? *Int J Biol Macromol* 15.
- Catalan, M.P., Aquino, F.C., Limjuco, R.P., 2014. Anticoagulant Activity of Pineapple (*Ananas comosus*) Extract on Human Blood Samples. *iamure.ijscel* 6. <https://doi.org/10.7718/iamure.ijscel.v6i1.768>
- Chakraborty, A., Mitra, S., Tallei, T., Tareq, A., Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, T., Simal-Gandara, J., Capasso, R., 2021. Bromelain a Potential Bioactive Compound: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life* 11, 317. <https://doi.org/10.3390/life11040317>
- Chen, H., McGowan, E.M., Ren, N., Lal, S., Nassif, N., Shad-Kaneez, F., Qu, X., Lin, Y., 2018. Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomark Insights* 13, 1177271918785130. <https://doi.org/10.1177/1177271918785130>
- Compton, S.J., Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151.
- Errasti, M.E., Prospitti, A., Viana, C.A., Gonzalez, M.M., Ramos, M.V., Rotelli, A.E., Caffini, N.O., 2016. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 27.
- Farid Hossain, Md., Akhtar, S., Anwar, M., 2015. Nutritional Value and Medicinal Benefits of Pineapple. *IJNFS* 4, 84. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20150401.22>
- Fathimah, A.N., Wardani, A.K., 2014. Extraction and Characterization of Protease Enzyme from Moringa Leaves (*Moringa oliefera* Lamk.). *Jurnal Teknologi Pertanian* 15.
- Gandjar, I.G., Rohman, A., 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Gunawan, S.G., Setiabudy, R., Nafrialdi, Instiaty, 2016. Farmakologi dan Terapi, 6th ed. FKUI, Jakarta.
- Guo, H., Ban, Y.-H., Cha, Y., An, E.S., Choi, J., Seo, D.W., Park, D., Choi, E.-K., Kim, Y.-B., 2019. Comparative anti-thrombotic activity and haemorrhagic adverse effect of nattokinase and tissue-type plasminogen activator. *Food Sci Biotechnol* 28, 1535–1542. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00580-1>
- Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., 2012. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>
- Ilyas, N.M., Setiasih, S., Hudiyono, S., 2020. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Bromelain dari Bonggol dan Daging Buah Nanas (*Ananas comosus*). *CHEMICA* 21, 133. <https://doi.org/10.35580/chemica.v21i2.17983>
- Kementan, 2016. Komoditas Pertanian Sub Sektor Hortikultura. Kementerian Pertanian Republik Indonesia, Jakarta.
- Khan, W.U., Singh, H., Najmi, A.K., 2012. Multifarious Pharmacological Potentials of Pineapple Protease (Bromelain): a Momentary Gawk. *World Journal of Pharmaceutical Research* 5.
- Lupita, V.B., Saptarini, O., Susanti, L., 2015. Efek Perasan Kering Kulit Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) terhadap Waktu Perdarahan dan Pembekuan Darah pada Tikus Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Indonesia* 12.
- Maurer, H.R., 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use: CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 58, 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>

- Mohamad, N.E., Abu, N., Yeap, S.K., Alitheen, N.B., 2019. Bromelain Enhances the Anti-tumor Effects of Cisplatin on 4T1 Breast Tumor Model In Vivo. *Integr Cancer Ther* 18, 1534735419880258. <https://doi.org/10.1177/1534735419880258>
- Muhammad, Z.A., Ahmad, T., 2017. Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care - A review. *J Pak Med Assoc* . 67.
- Novaes, L.C. de L., Jozala, A.F., Lopes, A.M., Santos-Ebinuma, V. de C., Mazzola, P.G., Junior, A.P., 2015. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology Progress* 32.
- Nurhayati, D., Solihat, F., Mulia, S., Wibowo, Syamsuar, 2018. The Effect of Amonium Sulphate Concentra. *International Journal of Current Research* 10.
- Nurhayati, D., Sundara, Y., Merdekawati, F., 2020. Isolasi Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dengan Garam Dapur. *JRKPDB* 12, 348–355. <https://doi.org/10.34011/juriskesbdg.v12i2.1810>
- Nurhidayah, N., Masriany, M., Masri, M., 2013. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Batang Nanas (*Ananas comosus*) Berdasarkan Variasi pH. *Biogenesis* 1, 116–122. <https://doi.org/10.24252/bio.v1i2.457>
- P, I.Y., F, M.T., S, R.J., P, Y.H.S., 2011. Pengaruh Perbedaan Suhu dan Pelarut terhadap Nilai Aktivitas Enzim Bromelin Hasil Isolasi dari Ekstrak Bonggol Nanas. *Journal Mikrobiologi Industri Teknik Kimia*.
- Pang, W.C., Ramli, A.N.M., Hamid, A.A.A., 2020. Comparative modelling studies of fruit bromelain using molecular dynamics simulation. *J Mol Model* 26.
- Pavan, R., Jain, S., Shraddha, Kumar, A., 2012. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/976203>
- Poedjiadi, A., Supiyanti, F., 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press, Jakarta.
- Purba, N., Gunam, I.B.W., Wijaya, I.M.M., 2020. Produksi Enzim Selulase Kasar dari Isolat Bakteri B2S8 menggunakan Substrat Brangkas Jagung dengan Perlakuan Konsentrasi Inokulum dan Komposisi Media yang berbeda. *JRMA* 8, 267. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2020.v08.i02.p11>
- Rachmania, R.A., Wahyudi, P., Wardani, A.M., Insani, D.R., 2017. Molecular Weight Profile of Protease of Pineapple (*Ananas comosus* L.Merr) and Papaya (*Carica papaya* L.) Using SDS-PAGE Method. *ALCHEMY J.Pen.Kim* 13, 52. <https://doi.org/10.20961/alchimy.13.1.2540.52-65>
- Rachmawati, D., Sulistyowati, E., Gultom, T., 2015. Karakteristisasi Aktivitas Enzim Bromelin dari Kulit nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) yang Diamobilisasi dengan Silika Gel dan CMC. *UNY, Kimia, FMIPA*.
- Ramli, A.N.M., Aznan, T.N.T., Illias, R.M., 2016. Bromelain: from production to commercialisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97.
- Rohmah, M.K., Fickri, D.Z., 2020. Uji Aktivitas Antiplatelet, Antikoagulan, dan Trombolitik Alkaloid Total Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) secara in Vitro. *J Sains Farm Klin* 7, 115. <https://doi.org/10.25077/jsfk.7.2.115-125.2020>
- Salnus, S., Arwie, D., 2020. Ekstrak Antosianin dari Ubi Ungu (*Ipomoea batatas* L.) sebagai Pewarna Alami pada Sediaan Apusan Darah Tepi. *MAK* 11, 96. <https://doi.org/10.32382/mak.v11i2.1771>
- Sarkar, S., Ahmed, M., Mozumder, N.H.M.R., Saeid, A., 2017. Isolation and characterization of bromelain enzyme from pineapple and its utilization as anti-browning agent. *Process Engineering Journal* 1.
- Shalehah, A., Cahaya, N., 2015. Efek Perasan Kering Kulit Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) terhadap Waktu Perdarahan dan Pembekuan Darah pada Tikus Putih Jantan. *Pharmacy* 12.
- Tjay, T.H., Rahardja, K., 2015. *Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek Samping*, 7th ed. PT. Gramedia, Jakarta.
- Warsita, N., Fikri, Z., Ariami, P., 2019. Pengaruh Lama Penundaan Pengecatan Setelah Fiksasi Apusan Darah Tepi Terhadap Morfologi Eritrosit. *JAMBS* 6, 125. <https://doi.org/10.32807/jambs.v6i2.145>