

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NANAS (*Ananas comosus*) TERHADAP BAKTERI *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* SECARA IN VITRO

Umi Ghoni Tjiptoningsih*, Nabila Khalisha Trisanto**

*Departemen Periodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama), Jakarta

**Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama), Jakarta

Korespondensi: Umi Ghoni Tjiptoningsih, umighonitjiptoningsih@dsn.moestopo.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang: empat belas koma tiga persentase dari masyarakat Indonesia mengalami penyakit periodonsium. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah bakteri yang dapat ditemukan pada 90% dari penderita periodontitis agresif. Bakteri ini termasuk dalam golongan bakteri gram-negatif yang merupakan penyebab utama periodontitis agresif. Nanas (*Ananas comosus*) adalah tanaman buah yang mengandung enzim bromelin. Enzim ini berpotensi memiliki sifat antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui daya antibakteri dari ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 25%, 50% dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Metode: penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris secara in vitro. Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas. Penelitian ini dilakukan dengan ekstrak buah nanas dan kontrol positif (*chlorhexidine* 0,2%). Cawan petri agar diinkubasi pada lingkungan anaerob dengan suhu 35°C selama 18 jam. Perhitungan daya hambat dilakukan dengan mengukur zona bening di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong. Hasil: hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik dari pemberian ekstrak buah nanas 25%, 50% dan 100% dan *chlorhexidine* terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Nilai p pada pengaruh pemberian ekstrak buah nanas dan *chlorhexidine* adalah 0,000 ($p < 0,05$). Tidak terdapat zona bening di sekitar cakram kertas. Kesimpulan: tidak terdapat daya antibakteri dari ekstrak nanas (*Ananas comosus*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

Kata Kunci: daya antibakteri, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, buah nanas, metode difusi

ABSTRACT

Introduction: 14.3% of Indonesia's population suffers from periodontal disease. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is a bacterium that can be found in 90% of aggressive periodontitis patient. This bacterium is a gram-negative bacterium that is the main cause of aggressive periodontitis. Pineapple (*Ananas comosus*) is a fruit plant that contains an enzyme called bromelain. This enzyme could potentially have antibacterial characteristics. The purpose of this study is to have an understanding on antibacterial effects of pineapple extract with the concentration of 25%, 50% and 100% on the growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Methods:** this research is a laboratory experiment that is done in vitro. The inhibition test is done by disc diffusion method using paper discs. This research is done using pineapple extract and positive control (*chlorhexidine* 0,2%). The agar petri dish is incubated in an anaerobic environment at 35°C for 18 hours. The result of inhibitory activities will be calculated based on the area of the clear zone around the paper disc using a vernier caliper. **Result:** statistically, there is a significant difference between the application of pineapple extract 25%, 50% and 100% and *chlorhexidine* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The p values on the effects of pineapple extract and *chlorhexidine* is 0,000 ($p < 0,05$). There are no clear zone surrounding the paper disc. **Conclusion:** there are no antibacterial effects of pineapple extract (*Ananas comosus*) on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

Keywords: antibacterial effects, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pineapple, diffusion method

PENDAHULUAN

Kesehatan gigi dan mulut perlu diperhatikan oleh masyarakat. Penyakit gigi dan mulut yang banyak diderita oleh masyarakat adalah penyakit periodontal dan karies gigi.^{1,2} RISKESDAS 2018 menyatakan bahwa presentase penduduk yang mempunyai masalah gigi dan mulut di Indonesia, sebanyak 57.6%, dan sebanyak 14.3% dari penduduk Indonesia mengalami penyakit periodonsium. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan dalam persentase penduduk yang mempunyai masalah gigi dan mulut dari tahun 2013.³ Prevalensi penyakit gigi dan mulut dapat diturunkan dengan melakukan pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan herbal, yang diketahui pada penelitian terdahulu bahwa penggunaan pasta gigi herbal memiliki dampak penurunan indeks plak yang lebih tinggi dibandingkan dengan pasta gigi non-herbal.^{1,4-5}

Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 381/Menkes/III/2007 tentang Kebijakan Obat Tradisional menyatakan bahwa terdapat 30.000 spesies tumbuhan hidup di kepulauan Indonesia. Salah satu tumbuhan yang sering digunakan sebagai obat alternatif dibidang kedokteran dan kedokteran gigi yang memiliki efek anti-inflamasi adalah ekstrak buah nanas. Buah nanas (*Ananas comosus*) adalah tanaman buah berupa semak yang menjadi bagian dari keluarga *Bromeliaceae*. Buah nanas mengandung banyak zat gizi yaitu kalsium, kalium, serat, vitamin (vitamin C, vitamin A dan vitamin E), komponen bioaktif yang dikelompokkan sesuai dengan karakteristik strukturnya yaitu karotenoid, flavonoid, asam phenolik, glukosinولات, komponen diet, fitosterol dan molekul yang sangat aktif yaitu asam askorbig, serta enzim kompleks yang dapat mengobati berbagai kondisi patologis, yaitu enzim bromelin. Adanya enzim bromelin pada buah nanas menyebabkan buah nanas digunakan sebagai obat anti-inflamasi, meredakan adanya pembengkakan pada saat kondisi inflamasi, seperti sinusitis akut, sakit tenggorokan, artritis, pirai. Bromelin yang ditemukan pada ekstrak kulit nanas efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*.^{1,6}

Berdasarkan penjelasan di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai daya antibakteri ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) secara in vitro dengan menggunakan metode uji daya hambat antibakteri yaitu uji difusi cakram kertas. Peneliti melakukan penelitian menggunakan ekstrak buah nanas.^{1,7}

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian yang bersifat eksperimental laboratoris dengan desain

post test only group. Tempat penelitian di Laboratorium Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong. Waktu Penelitian Juli – Agustus 2019. Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sampel yang digunakan adalah ekstrak daging buah nanas (*Ananas comosus*) 25%, 50% dan 100% dan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Besar sampel dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok yang terdiri dari

Kelompok A : ekstrak nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 100%

Kelompok B : ekstrak nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 50%

Kelompok C : ekstrak nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 25%

Kelompok D : *chlorhexidine* sebagai kontrol positif

Jadi jumlah perlakuan (t) adalah 4

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 3.75$$

$$n \geq 4.75$$

$$n = 5$$

Jumlah sampel yang diperlukan untuk masing-masing perlakuan adalah 5 dengan total keseluruhan adalah 20 sampel. Jumlah sampel (n) yang digunakan adalah 5, artinya pada kelompok A, B, C, D (4 variabel) dilakukan sebanyak 5 kali percobaan. Kriteria Inklusi penelitian ini adalah koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang tumbuh pada media *Mueller Hilton Agar* dengan perlakuan dan diinkubasi pada lingkungan anaerob pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kriteria eksklusi adalah koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang tumbuh pada media *Mueller Hilton Agar* disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

Pembuatan Ekstrak Buah Nanas

Pembuatan ekstrak buah nanas dengan mengupas kulit nanas dan ambil bagian daging nanas tersebut (*Ananas comosus*). Irisan daging buah nanas kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

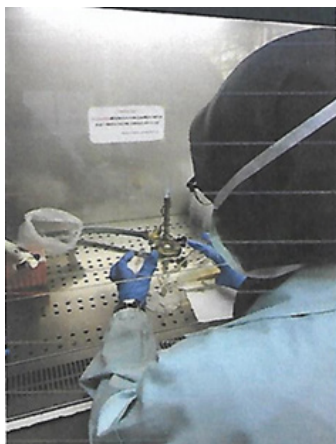
Nanas yang sudah diblender disentrifugasi di dalam sentrifus hingga terbagi menjadi dua lapisan yaitu bening pada bagian atas dan keruh pada bagian bawah. Bagian yang bening diambil untuk digunakan sebagai ekstrak buah nanas dengan konsentrasi 100%. Ekstrak nanas dengan konsentrasi 50% dapat dibuat dengan mencampurkan 10 ml akuades steril dengan 10 ml ekstrak nanas dengan konsentrasi 100%. Pembuatan ekstrak nanas dengan konsentrasi 25% dapat dibuat dengan mencampurkan 15 ml akuades steril dengan 5 ml ekstrak nanas dengan konsentrasi 100% (Gambar 1).



Gambar 1. Pembuatan Ekstrak Buah Nanas

Pembuatan Media *Mueller Hilton* Agar

Pembuatan media *Mueller Hilton* Agar diawali dengan melakukan standarisasi timbangan menggunakan kertas. Larutkan 7,2 gram bubuk ke dalam 144 ml akuades steril untuk membuat 24 petri (20 ml/petri). Panaskan di atas tungku pemanas magnetik sampai mendidih. Media yang telah masak, disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit dengan tekanan udara 2 atm suhu 121°C. Simpan media dalam lemari pendingin. Jika media ingin digunakan maka harus dipanaskan kembali hingga mendidih lalu dituangkan ke dalam masing-masing petri dan dibiarkan hingga dingin (Gambar 2).



Gambar 2. Pembuatan Media *Mueller Hilton* Agar

Pembiakan Spesimen

Jarum *oese* disterilkan di atas api spiritus sampai berwarna membara. Sediaan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dimasukkan ke dalam kaldu

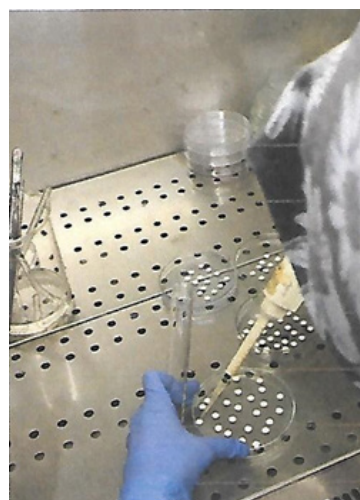
brain heart infusion (BHI) lalu ratakan dengan jarum *oese*. Kaldu BHI tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C agar bakteri mengalami pertumbuhan (Gambar 3).



Gambar 3. Pembiakan spesimen

Penentuan Daya Antibakteri Menggunakan Metode Difusi Cakram

Plat *Mueller Hilton* Agar dibagi menjadi lima bagian. Plat *Mueller Hilton* Agar diusapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menggunakan kapas steril. Kertas steril dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi. Tabung reaksi A dituangkan ekstrak buah nanas 100%. Tabung reaksi B dituangkan ekstrak buah nanas 50%. Tabung reaksi C dituangkan ekstrak buah nanas 25%. Tabung reaksi D dituangkan *chlorhexidine*. Kertas saring tersebut diambil dengan menggunakan pinset dan diletakkan di atas plat *Mueller Hilton* Agar. Plat media agar tersebut dilakukan penyetaraan suhu, lalu dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu 4° C selama 1 jam. Plat kemudian diinkubasi pada suhu 37° C dan dilakukan pengamatan pada seluruh sampel saat pengukuran diameter daya hambat (Gambar 4).



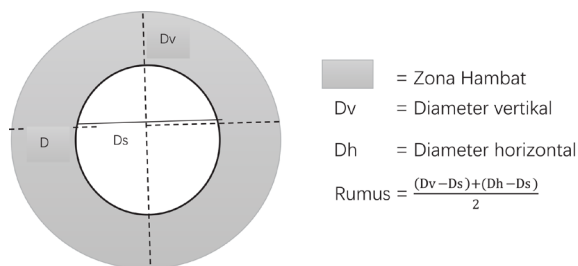
Gambar 4. Penentuan Daya Antibakteri Menggunakan Metode Difusi Cakram

Pengukuran Zona Hambat

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan setelah inkubasi dengan menggunakan rasio perbandingan antara besar diameter terluar zona hambat dengan diameter kertas saring. Cara pengukuran rata-rata diameter zona hambat menggunakan jangka sorong, dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Pengukuran diameter daya hambat



Gambar 6. Diameter Pengukuran Zona Hambat⁸

Interpretasi hasil Rerata diameter zona hambat dapat diinterpretasikan menjadi:⁸

Diameter >20 mm: daya hambat sangat kuat (bakteri sangat rentan)

Diameter 10-20 mm: daya hambat kuat (bakteri rentan)

Diameter 5-10 mm: daya hambat cukup/medium (bakteri cukup rentan)

Diameter <5 mm: daya hambat kurang (bakteri resisten)

Analisis Data

Analisis data ini dilakukan dengan *comperative analysis* dengan bantuan program SPSS (*Statistic Product of Service Solutions*) 22 for Mac. Sebelum dilakukan uji hipotesis, maka setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diuji normalitasnya dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk (karena sampel yang digunakan <50). Data penelitian yang berdistribusi

normal dan variannya homogen kemudian dianalisis dengan menggunakan *one-way anova* dengan *post hoc Bonferroni* untuk mengetahui antara perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan konsentrasi 100%, 50% dan 25% dari ekstrak buah nanas pada masing-masing sampel.

HASIL PENELITIAN

Daya hambat ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* digunakan metode difusi cakram. Daya hambat dilihat dari diameter zona hambat, yaitu bakteri tidak tumbuh di sekitar cakram kertas yang ditandai dengan adanya daerah bening (*clear zone*). Daerah bening akan diukur dengan jangka sorong dalam satuan milimeter. Hasil penelitian dapat dilihat pada gambar 6.

Pada penelitian ini dapat dilakukan uji *t independent* syarat untuk melakukan analisa data dengan uji *t independent* adalah data harus terdistribusi normal dan variannya homogen. didapatkan $p < 0,05$. Maka dari itu terdapat perbedaan bermakna antara daya hambat *chlorhexidine* dan daya hambat ekstrak buah nanas 25%, 50%, dan 100%. Berdasarkan hasil penelitian ekstrak buah nanas 25%, 50%, dan 100% tidak terdapat daya hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($p = 0,000$), melainkan *chlorhexidine* yang memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tabel 1 dan 2).

Rerata daya hambat ekstrak buah nanas 25%, 50%, dan 100% terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah 0 mm, lebih rendah secara bermakna dibandingkan rerata daya hambat *chlorhexidine*, yaitu 6,08 mm. Pada *chlorhexidine*, daya hambat tertinggi adalah 6.66 mm dan terendah 5,77 mm (Gambar 7).



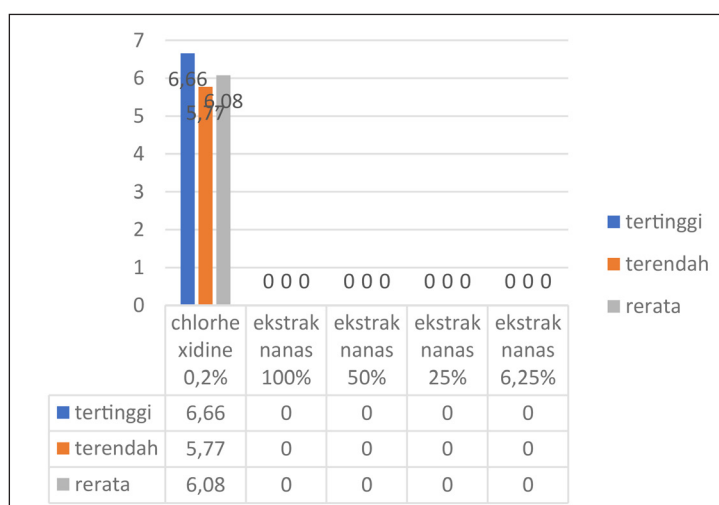
Gambar 7. Hasil Penelitian Ekstrak Buah Nanas 25%, 50%, 100%, Dan Chlohexidine

Tabel 1. Hasil Uji *t independent* Untuk Perbandingan Ekstrak Nanas Dan *Chlorhexidine* (Vertikal)

	Mean	SD	p
Ekstrak nanas 100	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.1575	0.4674	
Ekstrak nanas 50	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.1575	0.4674	
Ekstrak nanas 25	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.1575	0.4674	

*p ≤ 0.05, CI 95%, *Independent t-test***Tabel 2.** Hasil Uji *t independent* Untuk Perbandingan Ekstrak Nanas Dan *Chlorhexidine* (Horizontal)

	Mean	SD	p
Ekstrak nanas 100	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.0760	0.3791	
Ekstrak nanas 50	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.0760	0.3791	
Ekstrak nanas 25	6.0000	0.0000	0.000*
<i>Chlorhexidine</i>	12.0760	0.3791	

*p ≤ 0.05, CI 95%, *Independent t-test***Gambar 7.** Histogram Daya Hambat Kelompok Perlakuan Dan Kelompok Kontrol Terhadap Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***Tabel 3.** Frekuensi Kategori Zona Hambat

	Kategori zona hambat	Frekuensi	Persen %
Ekstrak Buah nanas 25%, 50%, 100%	Tidak memiliki	5	50%
<i>Chlorhexidine</i>	Lemah	5	50%
		10	100%

Tabel 3 di atas menunjukkan dari 10 perlakuan uji terhadap 5 sampel ekstrak buah nanas 25%, 50%, dan 100% yang tidak memiliki daya hambat dan 5 sampel *chlorhexidine* yang memiliki daya hambat dengan kategori lemah dalam menghambat

bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Seluruh sampel ekstrak buah nanas menunjukkan tidak ada daya hambat ekstrak buah nanas terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak buah nanas 25%, 50%, dan 100% tidak memiliki area bening di sekitar area cakram kertas, sedangkan *chlorhexidine* mempunyai area bening di sekitar cakram kertas, hal ini menunjukkan bahwa *chlorhexidine* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan tetapi ekstrak nanas 25%, 50%, dan 100% tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri ini. *Chlorhexidine* 0,2% memiliki efek antimikroba yang signifikan pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Chlorhexidine* adalah zat antimikroba yang berspektrum luas sehingga memiliki efek antimikroba terhadap bakteri gram-positif, gram-negatif, bakteri aerob dan anaerob dan juga fungsi. *Chlorhexidine* sering dijadikan acuan antiseptik oral karena adanya efek antibakteri yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang diikuti dengan koagulasi makromolekul pada sitoplasma. Ion positif pada *chlorhexidine* akan melekat pada ion negatif pada permukaan sel mikroba. Hal ini akan menyebabkan disorganisasi pada membran sitoplasma, sehingga menyebabkan terjadinya penetrasi ke dalam sitoplasma dan menyebabkan kematian mikroorganisme.^{8,9}

Secara teori, ekstrak buah nanas dapat menghambat perkembangan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Hal ini disebabkan karena buah nanas mengandung beberapa kandungan yang dapat memiliki daya antibakteri. Kandungan tersebut adalah vitamin C dan bromelin.^{7,10} Bromelin yang ditemukan pada ekstrak kulit nanas efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*.^{6,11} *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah bakteri gram negatif yang memiliki ukuran 0.5-0.8 µm x 0.6-1.4 µm. Pada umumnya, bakteri ini yang berbentuk bola, namun dapat juga ditemukan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) yang berbentuk batang. Pada dinding sel gram negatif terdapat protein, lipoprotein, lipopolisakarida dan lapisan peptidoglikan pada membran luar dan protein pada membran dalam. Bromelin dapat mengubah struktur dinding sel pada bakteri tersebut yaitu menghancurkan ikatan asam amino pada lokasi tertentu dan membaginya dari sebuah rantai asam amino menjadi fragmen-fragmen peptida. Bromelin akan mengubah protein porin yang mengandung asam amino untuk mengatur keluar dan masuknya molekul melalui membran sel, sehingga aktivitas tersebut terganggu. Hal ini akan menyebabkan terhambatnya perkembangan bakteri.^{9,10,13}

Kesalahan pada penelitian ini dapat disebabkan oleh pemilihan jenis nanas yang digunakan. Pada penelitian ini peneliti menggunakan nanas Honi. Nanas Honi adalah nanas yang memiliki kadar gula yang tinggi meskipun memiliki rasa yang sedikit

masam, jika kadar gula yang terkandung tinggi akan lebih mudah untuk pertumbuhan bakteri terjadi.¹⁴⁻¹⁶ Enzim bromelin bekerja paling maksimal pada suhu 45°C, hal ini dapat menyebabkan adanya kesalahan pada penelitian ini dikarenakan pada metode difusi, sampel harus dinkubasi pada suhu 35°C, sehingga memungkinkan enzim bromelin tidak bekerja secara maksimal. Selain itu penelitian menggunakan metode difusi memiliki beberapa kekurangan lain, salah satunya adalah penggunaan cakram kertas. Pada penelitian ini terdapat kemungkinan bahwa ekstrak yang digunakan tidak homogen, yaitu sebagian besar zat aktif memiliki berat molekul yang tinggi sedangkan zat lain dari molekul memiliki berat molekul yang rendah. Hal ini biasanya terjadi pada ekstrak yang mudah mengendap seperti ekstrak buah nanas yang digunakan. Jika hal ini terjadi maka tidak semua zat aktif akan terserap ke dalam cakram kertas karena perbedaan molekul tersebut.¹⁷⁻¹⁸

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan analisis data dan hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak nanas (*Ananas comosus*) terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*) tidak dapat digunakan sebagai bahan anti bakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulan di atas maka dapat disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya hambat ekstrak buah nanas terhadap pertumbuhan bakteri patogen lainnya pada penyakit periodonsium. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efektivitas ekstrak buah nanas dengan konsentrasi dan metode yang berbeda untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Perlu dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui jenis dan jumlah kandungan setiap senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak buah nanas yang dapat menghambat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tristanto NK. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Nanas (*Ananas Comosus*) 6,25% terhadap Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara in-vitro [skripsi] Jakarta: FKG Universitas Prof. Dr. Moestopo (Beragama); 2019,1-3,43-48
2. Pratiwi RA, Adhani R, Ramadhani K. Hubungan Tingkat Pengetahuan Masyarakat Terhadap Pelayanan Konseling Gigi di Puskesmas Kabupaten Hulu Sungai Utara. *Dentino. Jur Ked Gigi*. 2017;2(1):68-71.
3. Laporan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). DEPKES RI. 2018. 184-198.

4. INFODATIN Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI Situasi Kesehatan Remaja. 2015.
5. Putra FS, Mintjelungan CN, Juliatri. Efektivitas Pasta Gigi Herbal dan Non-Herbal Terhadap Penurunan Plak Gigi Anak Usia 12-14 Tahun. *Jurnal e-GiGi*. 2017;5:152-8.
6. Kebijakan Obat Tradisional Nasional. 2017. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 381/Menkes/SK/III/2007 Tanggal 27 Maret 2007
7. Paliling A, Posangi J, Anindita PS. Uji daya hambat ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Jurnal e-GiGi*. 2016;4(2):229-34.
8. Raja M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *Journal Of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(9):13-6.
9. Åberg CH, Kelk P, Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence*. 2014;6(3):188-95.
10. Lobo MG, Paull RE. *Handbook of pineapple technology: production, postharvest science, processing and nutrition*. Chichester, UK: Wiley Blackwell; 2017:221 - 40.
11. Vasconcelos DP, Silva FPD, Vasconcelos ACG, Alves EP, Junior PDO, Oliveira JD. Bromelain: A Potential Strategy for the Adjuvant Treatment of Periodontitis. *Dental Hypotheses*. 2016;7(3):88-93.
12. Putri RD, Andriani I. Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [thesis]. 2016.
13. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3859-69.
14. Eshamah H, an I, Naas H, Rieck J, Dawson P. Bactericidal Effects of Natural Tenderizing Enzymes on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Research*. 2013;2(1):8.
15. Zhou X, Li Y. *Atlas of oral microbiology from healthy microflora to disease*. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 2015:84-100.
16. Hossain F. World pineapple production: An overview. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 2016;16(4):11443-56.
17. Dubey R, Reddy S, Murthy N. Optimization of Activity of Bromelain. *Asian Journal of Chemistry*. 2012;24(2):1429-31.
18. Nanas: Cara Tepat Untuk Memilih dan Mengolahnya [Internet]. *ResepKoki*. ResepKoki; 2018. Tersedia di: <https://resepkoki.id/tips-trik-untuk-memilih-dan-mengolah-nanas> [diakses 18 Februari 2019]