EFEK ANTIBIOTIK BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Corynebacterium diphtheriae* DAN *Corynebacterium striatum* SECARA IN VITRO DENGAN METODE DIFUSI SUMURAN

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

Fitriya Sholihah

155070101111060

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Judul i
Halaman Persetujuan ii
Halaman Pengesahan iii
Pernyataan Keaslian Tulisan iv
Kata Pengantar v
Abstrak vii
Abstract viii
Daftar Isi ix
Daftar Tabel xiii
Daftar Gambar xiv
Daftar Lampiran xv
Daftar Singkatan xvi
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.3.1 Tujuan Umum 3
1.3.2 Tujuan Khusus 3
1.4 Manfaat Penelitian 4
1.4.1 Manfaat Akademis 4
1.4.2 Manfaat Praktis 4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 *Corynebacterium diphtheriae* 5
2.1.1 Karakteristik 5
2.1.2 Toksonomi 6
2.1.3 Patogenesis 6

2.1.4 Manifestasi Klinis.....7
2.1.5 Identifikasi *Corynebacterium diphtheriae*.....7
2.2 *Corynebacterium striatum* 8
2.2.1 Karakteristik 8
2.2.2 Toksonomi..... 9
2.2.3 Pemeriksaan Kultur..... 9
2.3 Biji Jinten hitam *(Nigella sativa)*..... 9
2.3.1 Karakteristik 9
2.3.2 Taksonomi..... 12
2.3.3 Kandungan kimia biji *Nigella sativa* efek antibiotik.....12
2.3.4 Manfaat.....14
2.3.5 Persebaran Geografi dan ekonomi.....17
2.3.6 Ekstraksi..... 18
2.4 Metode Ekstraksi.....18
2. 5. Jenis-jenis ekstraksi.....19
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS..... 20
3.1 Kerangka Konsep 21
3.2 Hipotesis..... 22
BAB IV METODE PENELITIAN..... 23
4.1 Desain Penelitian..... 23
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian 23
4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel..... 23
4.4 Variabel Penelitian..... 24
4.1.1 Variabel Independen 24
4.1.2 Variabel Dependen..... 25
4.5 Definisi Operasional 25
4.6 Alat dan Bahan..... 26

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol 96%.....26
4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....26
4.5.3 Pembuatan Medium 33
4.7 Prosedur Penelitian.....29
4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Biji *Nigella Sativa*.....*29*
4.7.2 Persiapan Bakteri uji.....30
4.7.2.1 Tes Identifikasi 30
4.7.2.1.1 Pewarnaan Gram 30
4.7.2.1.2 Pewarnaan Neisser 31
4.7.2.1.3 Tes Katalase..... 31
4.7.2.1.4 Uji Biokimia 31
4.7.2.1.5 CTBA 32
4.7.2.2 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri 32
4.7.2.3 Pengujian efek Antibiotik.....34
4.8 Analisis Data..... 35
4.9 Rancangan Operasional..... 36
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA..... 37
5.1 Hasil Penelitian 37
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri 37
5.1.1.1 Pewarnaan Gram 37
5.1.1.2 Pewarnaan Neisser 39
5.1.1.3 Uji Katalase 40
5.1.1.4 Kultur CTBA.....41
5.1.1.5 Uji Biokimia 42
5.1.1.6 Hasil Ekstrak Biji Nigella Sativa.....44
5.1.2 Hasil Penelitian Pendahuluan 44
5.1.3 Hasil Penelitian Inti..... 45
5.1.4 Hasil Pengukuran Diameter Zona Inhibisi..... 51

5.2 Analisis Data 54
5.2.1 *Corynebacterium diphtheria* 54
5.2.1.1 Hasil Uji Normalitas Data 54
5.2.1.2 Hasil Uji Homogenitas Varian 54
5.2.1.3 Hasil Uji Korelasi Pearson 57
5.2.2 *Corynebacterium striatum* 59
5.2.2.1 Hasil Uji Normalitas Data 59
5.2.2.2 Hasil Uji Homogenitas Varian 60
5.2.2.3 Hasil Kruskal Walis 60
5.2.2.4 Hasil Uji Korelasi Pearson 62
BAB VI PEMBAHASAN 64
BAB VII PENUTUP 71
7.1 Kesimpulan 71
7.2 Saran 71
DAFTAR PUSTAKA 72
LAMPIRAN 75

HALAMAN PENGESAHAN

EFEK ANTIBIOTIK BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Corynebacterium diphtheriae* DAN *Corynebacterium striatum* SECARA IN VITRO DENGAN METODE DIFUSI SUMURAN

Oleh:

Fitriya Sholihah

NIM 155070101111060

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 05 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Djoko Santoso, M.Kes. DAHK
NIP/NIK. 000848051

Pembimbing-I/Penguji-II,

dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si
NIP. 198208092009122004

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr.Elly Mayangsari, M.Biomed
NIP.198405162009121005

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

Abstrak

Sholihah, Fitriya. 2018. **Efek Antibiotik Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Corynebacterium Diphtheriae* Dan *Corynebacterium Striatum* Secara *In Vitro.*** Tugas Akhir. Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si. (2) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed

Corynebacterium diphtheriae adalah patogen penyebab difteri yang pemberian antitoksin sebagai obat masih sering menyebabkan reaksi hipersensitivitas. *Corynebacterium striatum* adalah patogen penyebab infeksi nosokominal yang biasanya terjadi pada pasien *multiple drug resistant*. Dibutuhkan antibiotik alternatif yang dapat menghambat kedua bakteri tersebut, dimana *Biji Nigella sativa* merupakan biji yang telah diketahui memiliki banyak manfaat, salah satunya sebagai antibiotik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas ekstrak biji *Biji Nigella sativa* dalam menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*. Metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran dengan 10 cawan petri, 5 untuk kelompok *Corynebacterium diphtheriae* dan 5 untuk kelompok *Corynebacterium striatum*. Setiap cawan petri berisi ekstrak *Biji Nigella sativa* dengan 7 macam konsentrasi, 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, dan 0% (kontrol negatif). Lalu, diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Rerata zona hambat *Corynebacterium diphtheriae* dari ektrak konsentrasi rendah ke tinggi berturut-turut adalah 13,2 mm, 15,0 mm,16,16 cm, 17.28 mm, 18,64 mm, dan 19,74 mm. Rerata zona hambat *Corynebacterium striatum* dari ektrak konsentrasi rendah ke tinggi berturut-turut adalah 18,85 mm, 19,36 mm, 20,19 cm, 19,84 mm, 21,04 mm, dan 22,80 mm. Pada *Corynebacterium diphtheriae*, hasil One-way ANOVA p=0,00 (p<00), korelasi pearson p=0,000 (p<0,05) dengan koefisien korelasi 0,951. Pada *Corynebacterium striatum,* hasil Kruskal walis adalah x^2 (7,228) dengan p=0,204 < x^2_{tabel} (11,071) p>0,05 dan hasil korelasi *Pearson* adalah 0,277 (p<0,05) dengan koefisien korelasi sebesar 0,217. Kesimpulannya, ekstrak biji *Biji Nigella sativa* mempunyai potensi antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheria* dan *Corynebacterium striatum*. Tapi, pada *Corynebacterium striatum,* konsentrasi ekstrak *Biji Nigella sativa* tidak memberikan efektifitas yang signifikan, begitupun secara statistik.

Kata Kunci : antibiotik, *Biji Nigella sativa, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium striatum*

Abstract

Sholihah, Fitriya. 2018. **The Antimicrobaal Effect of Seed *Biji Nigella sativa Sativa* to *Corynebacterium Diphtheriae* and *Corynebacterium Striatum In Vitro.*** Final Project. Medical Bachelor Degree Program, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. Counselor : (1) dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si. (2) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed

Corynebacterium diphtheriae is the pathogen of the diphtheria which one of method to cure the disease is using the anti-toxin but the number of hypersensitivity is still high. Corynebacterium striatum is the pathogen causes nosocomial infection, which commonly happens in multiple drugs resistant patient. So, it is needed the alternative antibiotic which can inhibits both of the bacterias. However, Nigella sativa is the plant which is already known has a lot of benefits, one of them is antibacterial effect. So, goal of the research is to understand the effectivity of Nigella sativa seed extract to inhibit the growth of both, Corynebacterium diphtheriae and *Corynebacterium striatum. The method that used is disc diffusion method using 10 discs, 5 for Corynebacterium diphtheriae group and 5 for Corynebacterium striatum group. Every disc is filled with Nigella sativa extract which has 7 concentrations, 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, and 0% (negative control). Then, it was incubated at 37°C for 18-24 hours. The averages inhibition zone diameters of Corynebacterium diphtheriae from highest concentration to lowest concentration are 13,20 mm, 15,00 mm, 16,16 cm, 17,28 mm, 18,64 mm, and 19,74 mm. The averages inhibition zone diameters of Corynebacterium striatum from highest concentration to lowest concentration are 18,85 mm, 19,36 mm, 20,19 cm, 19,84 mm, 21,04 mm, and 22,80 mm. At Corynebacterium diphtheriae, the result of One-way ANOVA is p=0,00 (p<00), the result of Pearson correlation is p=0,000 (p<0,05) with correlation coefficient is 0,951. At Corynebacterium striatum, result of Kruskal walis is x^2 (7,228) with p=0,204 < x^2_{tabel} (11,071) p>0,05 and the result of Pearson correlation is 0,277 (p<0,05) with correlation coefficient is 0,217. So, the conclusion is Nigella sativa seed extract has the potency of antibacterial effect which can inhibit the growth of both Corynebacterium diphtheria and Corynebacterium striatum. But, for the Corynebacterium striatum, Nigella sativa extract concentration doesn't has the significant effect, so do the statistic of it.*

***Keywords** : antibacterial, Nigella sativa seed, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium striatum*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Corynebacterium diphtheriae adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit difteri respirasi dan kutaneus. Difteri adalah penyakit yang sering menginfeksi saluran pernafasan atas dan penyebab dari batuk, sakit tenggorokan dan malaise. Pada tahun 1994, tercacat prevalensi difetri sebesar 80.000 ribu kasus dan 2000 ribu kematian di Rusia (Brooks *et al., 2010;* Murphy., 1996). Berdasarkan data dari WHO (2017), Pada tahun 2014 tercatat 7,321 kasus difteri diseluruh dunia. dan 430 kasus di Asia. Di Indonesia sendiri terjadi peningkatan yang berarti pada kasus difteri, dengan puncaknya pada tahun 2012 terjadi 1192 kasus diseluruh indonesia. Jumlah itu turun 394 pada tahun 2014, tapi meski ditahun 2014 menurun pada tahun 2015 terjadi peningkatan 502 kasus. Dari data tersebut menunjukan bahwa difteri masih menjadi masalah global terutama untuk negara berkembang seperti Indonesia (Mulyastuti *et al*., 2017). Sebagian besar difteri dapat dikontrol sejak bayi dengan imunisasi yang adekuat. Survei menyebutkan bahwa keEfektifitas imunisasi difteri sekitar 97%. Akan tetapi, berdasarkan data tersebut masih ada 3% kemungkinan seseorang terkena difteri. Hingga saat ini, pasien dengan difteri dapat diobati dengan antibiotik, seperti penisilin dan eritromisin, serta menggunakan imunisasi pasif, yang berupa toksin difteri, untuk mengurangi angka kematian. Akan tetapi, dalam banyak kasus, toksin difteri hanya dimurnikan sebagian sebelum di inaktifasi dengan formaldehid. Hal ini dapat menimbulkan reaksi hipersensitivitas pada beberapa individu sehingga pasien harus dites alergi, berupa pemeriksaan serologi (*skin prick test*) sebelum di tatalaksana. Pemeriksaan tersebut pun membutuhkan waktu sekitar 48 jam untuk mengetahui hasilnya. Oleh karena itu, pengobatan tidak dapat langsung diberikan saat itu juga (Murphy., 1996)

Corynebacterium striatum adalah bakteri patogen yang sering menyebabkan infeksi nosocomial. Menurut data, wabah infeksi nosokomial *Corynebacterium striatum* terjadi pada pasien dengan penyakit paru obstruktif kronik yang berhubungan dengan pemakaian

antibiotik spektrum luas yang berulang dan digunakan dalam jangka waktu panjang sehingga terjadi *multiple drug resistant*. Oleh karena itu, pemilihan antibiotik untuk pengobatan infeksi *Corynebacterium striatum* menjadi semakin sulit, sehingga diperlukan alternatif pengobatan lain (Meyer *et al*., 2010).

Nigella sativa, yang juga dikenal dengan nama lain seperti jinten hitam atau habbatussauda merupakan salah satu biji yang sering digunakan dalam pengobatan herbal. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa *Nigella sativa* dapat bermanfaat sebagai anti-hipertensi, diuretik, anti-diare, analgesik, anti-diabetik, anti-kanker, bronkodilator, serta antibiotik. Berdasarkan penelitian Hannan et al pada tahun 2008, dikatakan bahwa *Nigella sativa* dapat berguna sebagai antibiotik karena mengandung 2 bahan aktif yaitu *thymoquinone* (TQ) dan melanin. *Nigella sativa* terbukti efektif terhadap *Staphylococcus aureus* dan *H. pylori*. Selain itu, *Nigella sativa* juga diketahui memiliki manfaat untuk proteksi pada pulmonary. Meskipun *Nigella sativa* telah terbukti memiliki efek antibakterial dan sifat proteksi pulmonal, tetapi, belum ada penelitian yang meneliti tentang sensitivitas *Nigella sativa* terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* (Ahmad *et al*., 2013).

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah *Nigella sativa* efektif terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* memberikan efek terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* secara in vitro?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian biji *Nigella sativa* terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* secara in vitro dengan metode difusi sumuran.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini :

1. Untuk mengetahui efek berbagai konsentrasi *Nigella sativa* yang dibutuhkan untuk menghambat laju pertumbuhan dari *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* (KHM) dengan menggunakan metode difusi sumuran .

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Manfaat penelitian ini dalam bidang akademik adalah sebagai bahan penambah sumber informasi ilmu kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, juga sebagai penilaian terhadap pemahaman mahasiswa tentang penelitian. Hasil penelitian ini nantinya dapat dijadikan sebagai pertimbangan untuk alternatif pengobatan untuk infeksi *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum.*

1.4.2. Manfaat Praktis

1) Memberi infomasi kepada masyarakat tentang penggunaan ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

Sumber penelitian untuk penelitian berikutnya.

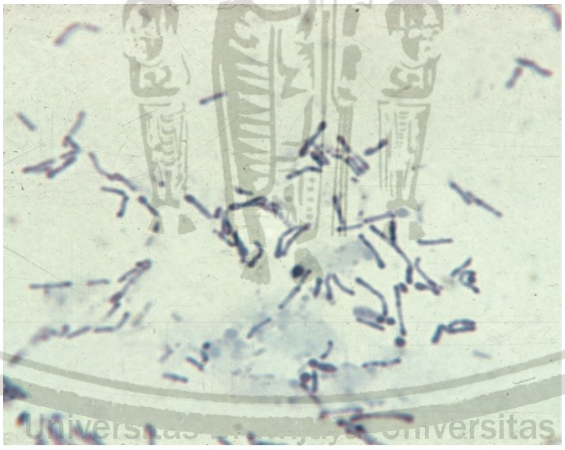
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Corynebacterium diphtheriae*

2.1.1. Karakteristik

Corynebacterium diphtheriae adalah bakteri basil gram positif yang tidak berspora, berkapsul, non-motil, dan *pleomorphic*, dengan diameter 0,5-1 μm dan panjang beberapa mikrometer. Terdapat empat biotipe *Corynebacterium diphtheriae* yang telah dikenal luas, yaitu gravis, mitis, intermedius, dan belfanti. Varian biotipe ini telah diklasifikasikan berdasarkan karakteristik pertumbuhan seperti morfologi koloni, reaksi biokimia, dan tingkat keparahan penyakit yang dihasilkan oleh infeksi. Sangat sedikit laboratorium referensi yang menyediakan karakterisasi biotipe karena kejadian difteri telah sangat menurun, dimana hubungan tingkat keparahan penyakit dengan biovar itu sendiri tidak cukup penting untuk penanganan klinis atau kesehatan masyarakat (Brooks *et al*., 2010)



Sumber : Brooks *et al.,* 2010

Gambar 1. Morfologi *Corynebacterium diphtheriae*

2.1.2. Taksonomi

Kingdom : Bacteria

Phylum : Actinobacteriae

Class : Actinobacteriae

Order : Actinomycelates

Family : Corynebacteriaceae

Genus : Corynebacterium

Spesies : Corynebacterium diphtheriae

(Murphy *et al*., 1996)

2.1.3. Patogenesis

Corynebacterium diphtheriae organisme yang kurang invasif, biasanya *C. diphtheriae* ada di lapisan superfisial pada mukosa pernafasan dan lesi kulit, sehingga *Corynebacterium diphtheriae* dapat menyebabkan peradangan ringan pada jaringan local (Meyer *et al*., 2010). Patogenesis *Corynebacterium diphtheriae* didasarkan pada dua faktor penentu utama: (1) kemampuan strain *Corynebacterium diphtheriae* untuk berkoloni di rongga nasofaring dan / atau pada kulit (2) kemampuannya untuk menghasilkan toksin difteri (Murphy *et al*., 1996).

Jadi *C. diphtheriae* memiliki eksotoksin yang poten, yang bekerja menghambat sintesis protein pada sel mamalia tapi pada bakteri tidak dapat menghambat. Toksin polipeptida ini terdiri dari dua segmen, yaitu: segmen B, yang bekerja untuk mengikat reseptor yang spesifik pada sel-sel yang rentan, dan segmen A, segmen aktif. Terjadi pembelahan dari molekul yang diikat segmen B, lalu segmen A memasuki sel untuk mengkatalisir inaktivasi translokasiase RNA transfer (tRNA). Toksin *C. diphtheriae* memefeki semua sel di dalam tubuh, namun efek yang paling menonjol adalah pada jantung (miokarditis), saraf (demyelination), dan ginjal (necrosis tubulus ginjal) (Meyer *et al*., 2010).

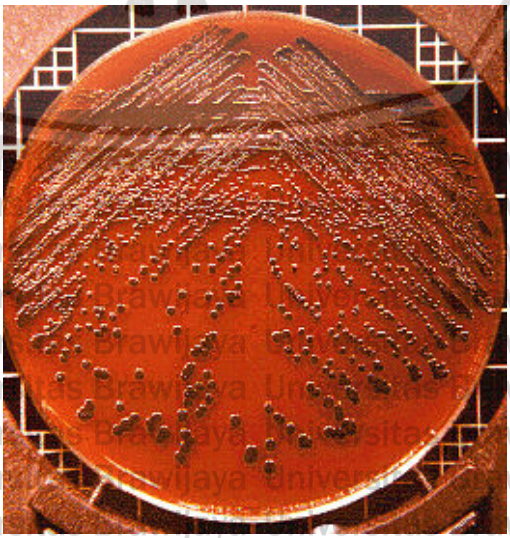
2.1.4. Manifestasi Klinis

Ada dua jenis difteri klinis: nasofaring dan kutaneous. Gejala difteri nasofaring bervariasi dari faringitis ringan sampai hipoksia yang terjadi karena penyumbatan jalan nafas oleh pseudomembran. Kelenjar getah bening leher juga bisa menjadi penyebab

pembengkakan leher yang hebat (*bull neck appearance*), pasien juga mungkin mengalami demam (≥ 103 ° F). Lesi kulit pada difteri kutaneous biasanya ditutupi oleh pseudomembrane berwarna abu-abu. Komplikasi sistemik yang mengancam jiwa, terutama kehilangan fungsi motorik (mis., Sulit menelan) dan gagal jantung yang kongestif, dapat terjadi akibat tindakan toksin difteri pada neuron motor perifer dan miokardium (Murphy *et al*., 1996; Brooks *et al*., 2010).

2.1.5. Identifikasi *Corynebacterium diphtheriae*

Menurut Brooks *et al.*(2010) *Corynebacterium diphtheriae* memiliki bentuk yang khas yaitu *club-shaped appearance* atau granula metakromatik yang paling bagus terlihat dengan pengecatan neisser. *Corynebacterium diphtheriae dan corynebacteria* lainnya tumbuh secara aerobik pada kebanyakan media laboratorium biasa. Pada media serum *Loeffler*, *corynebacteria* tumbuh jauh lebih mudah daripada organisme pernafasan lainnya, dan ada morfologi yang khas pada hasil kultur media *Loeffler* . Pada media agar dengan kalium tellurite, dapat membedakan 4 biotipe dari *Corynebacterium diphtheriae* berdasarkan morfologinya. Ditandai dengan warna coklat sampai hitam dengan lingkaran hitam berwarna coklat karena berkurangnya tellurite pada medium (*Staphylococcus dan Streptococcus* juga dapat menghasilkan koloni hitam) (Meyer *et al*., 2010).



Sumber : Meyer *et al.*, 2010

Gambar 2. Morfologi *Corynebacterium diphtheriae pada blood tellurite agar*

2.2. *Corynebacterium striatum*

2.2.1. Karakteristik

Corynebacterium striatum termasuk *Corynebacterium non diphtherie yang* masuk dalam klasifikasi Corynebacteria Non-lipopilik dan fermentative (Brooks *et al.*, 2010). *Corynebacterium striatum* juga dapat dianggap sebagai mikroorganisme oportunistik pada pasien dengan kondisi imunosupresif dan penyakit paru yang sudah ada sebelumnya. Dalam sejumlah penelitian dilaporkan berbagai spesies Corynebacterium yang menyebabkan berbagai infeksi pada kondisi khusus, terutama infeksi saluran nafas. Corynebacterium striatum dianggap sebagai mikroorganisme potensial patogen nosokomial yang bersifat multidrug resisten pada pasien dengan penyakit yang mendasari. Wabah nosokomial pertama C. striatum pada pasien dengan penyakit paru obstruktif kronik (COPD) dilaporkan pada tahun 2007. Demikian pula, bakteri tersebut dilaporkan bertanggung jawab atas endokarditis, bakteremia dan infeksi kulit (Díez-Aguilar *et al.*, 2013).

2.2.2. Taksonomi Corynebacterium striatum

Kingdom : Bacteria

Phylum : Actinobacteria

Order : Actinomycetales

Suborder : Corynebacterineae

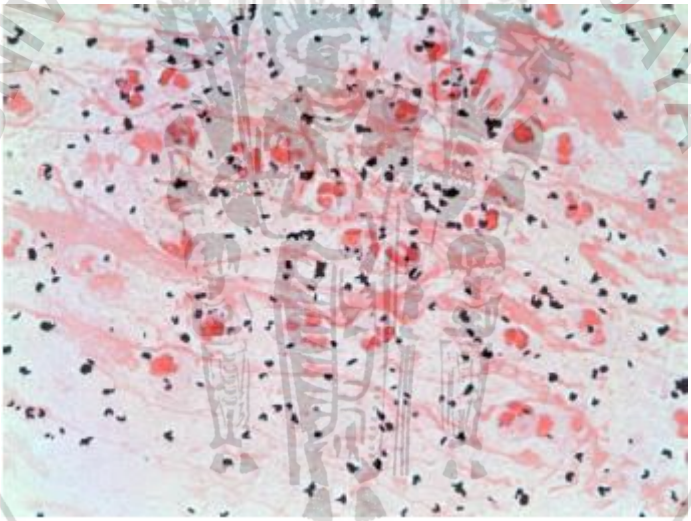
Famili : Corynebacteriaceae

Genus : Corynebacterium

Spesies : Corynebacterium striatum (Salem, 2015)

2.2.3. Pemeriksaan (Kultur)

Pada media agar darah tidak didapatkan hemolisis, berwarna putih, *moist*, dan halus. Media yang mengandung tellurite selektif untuk bakteri positif *tellurite-reduktase* (misalnya tiga spesies toksin *Corynebacterium* yang berpotensi toksigenik), tapi *C. jeikeium dan C. striatum* juga dapat tumbuh dan menghasilkan koloni berwarna kecoklatan karena reduksi tellurite (Berger *et al*., 2014). Corynebacterium striatum dapat menyebabkan infeksi pada aliran darah pada pasien dengan daya tahan tubuh lemah, terutama mereka yang menggunakan peralatan medis seperti kateter intravena. kateter adalah rute utama dimana flora normal kulit seperti Corynebacterium striatum memasuki aliran darah. Identifikasi isolate bakteri Corynebacterium striatum menunjukkan gram positif, katalase positif, nonmotil, dan aerobic atau fakultatif anaerob (Yang, 2015).



Sumber : Aguilar, 2013

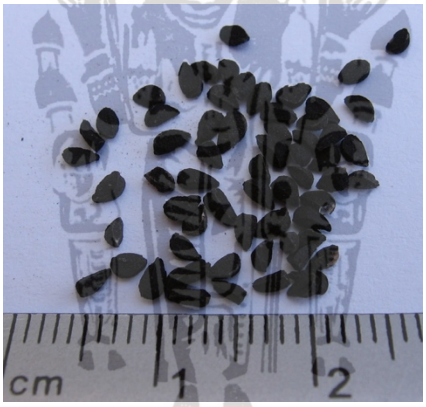
Gambar 2.5 Corynebacterium striatum pada pengecatan gram

2.3. *Nigella sativa*

2.3.1. Karakteristik

Berdasarkan penelitian Ahmad *et al* (2013) *Nigella sativa* merupakan tanaman bunga tahunan, yang tumbuh setinggi 20-30 cm, Buah dari *Nigella sativa* sendiri berukuran besar dan berkapsul berisi banyak biji. Secara makroskopik biji *Nigella*

sativa berdikotil kecil, *trigonus , angular,* memiliki sedikit bau aromatik dan terasa pahit. Secara mikroskopis, jika dilihat bagian transversal ada epidermis berlapis tunggal yang terdiri dari sel bulat panjang dan tebal, dibagian luar diselimuti oleh kutikula papilla yang mengandung warna coklat gelap. Lapisan Epidermis terdiri dari 2-4 lapis dinding yang tebal dan menjang hingga sel parenkim, diikuti oleh lapisan pigmen coklat kemerahan berdinding tebal dan panjang. Lapisan bagian dalam (*inner*) hingga ke lapisan pigmen, diantaranya terdapat suatu lapisan yang berdinding tebal berbentuk persegi panjang *(rectangular)* yang hampir mirip kolumnar, yaitu *elongated cells*. Endosperm terdiri dari sel-sel berdinding tipis, persegi panjang atau poligonal yang sebagian besar penuh dengan minyak globules (Paraakh., 2010). Biji *Nigella sativa* juga memiliki banyak nama yang berbeda seperti *black cumin (English), black caraway seeds (USA), shonaiz (Persian)* dan *kalajira (Bangali*) (Forouzanfar et al., 2014)



(Sumber : Paarakh., 2010)

Gambar 3. Makroskopik *Nigella sativa*

2.3.2. Taksonomi

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Divison : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Magnoliidae

Order : Ranunculales

Family : Ranunculaceae

Genus : Nigella L.

Species : Nigella sativa

(Paraakh., 2010)

2.3.3. Kandungan kimia biji *Nigella sativa* yang mempunyai efek antibiotik

Biji *Nigella sativa* mengandung banyak senyawa aktif yang sangat penting, antara lain minyak astiri atau *volatile oil : thymoquinone* (30-48%), *thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymene* (7 -15%), *carvacrol* (6 -12%), *4-terpineol* (2-7%), *t -anetol* (1% -4%), *sesquiterpene longifolene* (1% -8%) *α-pinene dan thymoletc.* Sebagian besar sifat farmakologis *Nigella sativa* disebabkan oleh komponen *quinine* dan TQ (*thymohydroquinone)* merupakan sumber *quinine* paling banyak (Ahmad *et al*., 2013). TQ menghasilkan dithymoquinone dan produk oligokondensasi yang lebih tinggi, TQ (*thymohydroquinone)* paling banyak berasal dari kandungan minyak atsiri. Biji dari *Nigella sativa* mengandung protein (26,7%), lemak (28,5%), karbohidrat (24,9%), serat kasar (8,4%) dan abu total (4,8%).[5] Biji *Nigella sativa* juga mengandung sejumlah saponin, alfa hederin dan vitamin mineral yang baik seperti Cu, P, Zn dan Fe dll (Forouzanfar *et al*., 2014)

Biji *Nigella sativa* mengandung beberapa senyawa penting lainnya, antara lain

dua jenis alkaloid yang berbeda; *alkaloid isoquinolin* misalnya: *nigellicimine dan nigellicimine- N- oxide*, dan *pyrazol alkaloid* atau *indazole ring bearing alkaloid* yang meliputi *nigellidine* dan *nigellicine*(Meyer *et al*., 2010). Menurut laporan Paraakh (2010) biji *Nigella sativa* mengandung minyak esensial lemak asam jenuh dan tak jenuh, pada minyak lemak jenuh utamanya mengandung asam linoleat (50-60%), asam oleat (20%), asam eikodadienoat (3%) dan asam dihomolinoleat (10%). lemak jenuh asam palmitat, dan asam stearat berjumlah sekitar 30%.

2.3.3.1 Saponin

Saponin adalah senyawa kimia jenis glikosida yang banyak ditemukan di berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini memiliki karakteristik berupa buih, sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih yang dapat bertahan lama. Selain itu, senyawa ini juga terdiri dari fat-soluble nucleus yang disebut aglycone yaitu triterpenoid atau alkaloid steroid. Triterpenoid saponin banyak terkandung di dalam kedelai, kacang polong, teh, bayam, ginseng dan lain-lain. Sedangkan steroid saponin banyak terdapat dalam tomat, asparagus, dan oat (Hostettmann, 1995). saponin bekerja dengan cara merusak membran sitoplasma dan membunuh sel. Saponin mampu berikatan dengan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan permeabilitas dinding bakteri meningkat (Forouzanfar *et al.,* 2014).

2.3.3.2 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang mengandung substansi dasar basa bernitrogen yang kebanyakan berbentuk heterosiklik. Alkaloid dapat diperolah dari tumbuhan maupun hewan (IUPAC, 1997). Alkaloid memiliki mekanisme kerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga sel bakteri tidak dapat membentuk dinding sel atau pembentukan dinding sel dari bakter itu tidak sempurna (Sjahid, 2008).

2.3.3.3 Minyak atsiri

Minyak atsiri mengandung beberapa senyawa penting seperti: *thymoquinone* (30-48%), *thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymene* (7 -15%), *carvacrol* (6 - 12%), *4-terpineol* (2-7%), *t -anetol* (1% -4%), *sesquiterpene longifolene* (1% -8%) *α-pinene dan thymoletc* (Ahmad *et al*., 2013). Dan paling banyak adalah kandungan *thymoquinone* yang juga berkerja sebagai zat aktif utama anti mikroba. Diduga berperan dalam membentuk komplek yang irreversibel dengan asam amino nukleofilik pada protein bakteri, sehingga menyebabkan inaktivasi protein berakibat sintesis RNA dan protein sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Asniyah,2009).

2.3.4. Manfaat

Biji *Nigella sativa* memiliki aktivitas biologis yang berpotensi digunakan sebagai terapi, terbukti dengan spektrum aktivitas yang luas. seperti diuretik, antihipertensi, antidiabetes, antikanker dan imunomodulator, analgesik, antibiotik, anthelmintik, analgesik dan anti-inflamasi, spasmolitik, bronkodilator, gastroprotektif, hepatoprotektif, sifat pelindung dan antioksidan ginjal. Biji *Nigella sativa* banyak digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit seperti bronkitis, asma, diare, rematik dan kelainan kulit, juga digunakan sebagai pencernaan, anti-diare, stimulan nafsu makan, untuk meningkatkan produksi susu pada ibu menyusui untuk melawan infeksi parasit, dan untuk mendukung sistem kekebalan tubuh (Forouzanfar *et al.,* 2014).

Sebagian besar sifat terapeutik tanaman ini disebabkan oleh adanya TQ (*thymohydroquinone)* yang merupakan komponen kimia aktif utama dari minyak atsiri. Biji *Nigella sativa* juga digunakan dalam makanan seperti bumbu penyedap pada roti dan acar karena memiliki tingkat toksisitas yang sangat rendah. TQ menunjukkan aktivitas bakterisida yang signifikan terhadap berbagai bakteri patogen manusia terutama Gram positif cocci (*Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*). Terbukti dari ekstrak kasar minyak astiri dari Biji *Nigella sativa* yang berbeda-beda diuji untuk melihat aktivitas antibiotiknya pada bakteri yang berbeda-

beda juga, yaitu terdiri dari 16 bakteri gram negatif dan 6 bakteri gram positif, Hasil dari Isolat ini menunjukkan bahwa gram negatif lebih berefek dibandingkan gram positif (Ahmad *et al.*, 2013). Ekstrak yang paling efektif adalah ektrak alkaloid dan ekstrak air (Paraakh., 2010).

2.3.4.1 Antidiabetes

Penelitian Bilal, 2009 membuktikan bahwa terjadi peningkatan kadar insulin dan penurunan gula darah puasa (GDP) signifikan pada 41 orang pasien DM tipe II setelah pemberian terapi minyak biji jintan hitam selama 40 hari. Terjadi peningkatan kadar insulin menunjukkan perbaikan fungsi pankreas. Pemberian Hal tersebut memunculkan dugaan bahwa biji jintan hitam berpotensi membantu regenerasi pankreas secara endogen. Efek antidiabetik biji jintan hitam telah banyak dibuktikan melalui penelitian eksperimental. Efek antidiabetik biji jintan hitam antara lain melalui efek protektif sel beta terhadap stres oksidatif , induksi proliferasi sel-â , menurunkan kadar MDA di jaringan pankreas, penurunan kadar plasma hormon leptin, meningkatkan ekspresi Glut-4 dan penurunan glukoneogenesis di hati (Paraakh, 2010).

2.3.4.2 Anti kanker

Nigella sativa memiliki berbagai metabolit sekunder dengan beragam aktivitas, salah satunya sebagai antikanker. *thymoquinone*, salah satu metabolit sekunder *Nigella sativa* diketahui memiliki aktivitas antikanker seperti kanker payudara baik ER-positif maupun HER2-positif. Selain itu terdapat pula berbagai metabolit sekunder lain yang juga memiliki aktivitas sebagai senyawa antikanker. Hasil penelitian melaporkan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* dengan *thymoquinone* sebagai zat aktif utamanya mempunyai efek sitotoksik terhadap lini sel kanker manusia, anti kanker hati, imunomodulasi (peningkatan fungsi sel-sel limfosit T dan B, sel NK, sel makrofag, sel CTL, produksi IL-2 dan 3, TNF-βdan menginduksi apoptosis. Thymoquinon juga

diketahui dapat menghambat sel-sel kanker yang telah resisten terhadap pengobatan anti kanker sebelumnya seperti cisplatin dan doxorubisin. Penelitian lainnya juga menyebutkan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* mengandung asam- asam lemak yang secara in vitro mempunyai efek sitotoksik sebesar 50% terhadap kanker-kanker hati *Ehrilch Ascites Carcinoma* (EAC), *Dalton's lymphoma Ascites* (DLA) dan sel kanker ganas Sarkoma-180, dan secara in vivo dapat menghambat perkembangan EAC secara sempurna (Hendrik, 2005).

2.3.4.3 Anti inflamasi

Thymoquinone yang terkandung dalam biji jintan hitam dapat menghambat jalur siklooksigenase dan lipooksigenase dari metabolisme arakidonat. Thymoquinone juga dapat menghambat peroksidasi non enzimatik. Asam lemak tidak jenuh yang tidak lazim yang mirip dengan asam arakhidonat juga berperan menghambat substrat. Hal ini mendukung fakta bahwa biji jintan hitam berperan sebagai anti inflamasi (Alemi et al. 2012).

2.3.5. Persebaran Geografi dan ekonomi

Tanaman jintan hitam merupakan tumbuhan herbal yang tumbuh dalam kala tahunan, biasanya ditanam di daerah pegunungan atau sengaja ditanam sebagai rempah-rempah. jintan hitam berasal dari daerah Eropa Selatan, Afrika Utara, dan barat daya dari Asia, serta telah dibudidaya didaerah Mediteranian, Eropa Utara, India, Pakistan, Syria, Turki, dan saudi Arab. Pertumbuhan telah banyak dilakukan di negara asal tanaman ini terutama di dataran tinggi, namun belum banyak diteliti tentang pertumbuhan dan produksi tanaman ini di daerah tropika, khususnya Indonesia. Penelitian tentang Biji *Nigella sativa* di Indonesia dilakukan oleh Ridwan *et al*. (2014) dan Suryadi (2014), yang melaporkan bahwa tanaman ini dapat tumbuh di wilayah dataran tinggi Indonesia (1,315 mdpl) dengan kisaran suhu minumum – maksimum 15.48 – 26.26 ^{0}C.

Berdasarkan data hasil survei luas panen biji *Nigella sativa* di Indonesia dari tahun 2012-2015 terjadi peningkatan sebesar 36,2% untuk panen biji *Nigella sativa* paling banyak terdapat di Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Sulawesi Tengah, Aceh, dan Bengkulu (Badan pusat statistik, 2015) .

Harga biji *Nigella sativa* tergolong terjangkau, pada Balai Materia Medika Kota Batu didapatkan biji *Nigella sativa* seharga 16.000 rupiah untuk 500gr (Balai Materia Medika, 2017).

2.3.6. Cara Ekstraksi

Pada Biji *Nigella sativa* sebetulnya banyak cara untuk peekstrakannya, salah satunya yang efektif adalah ekstrak dengan pelarut etanol dan air (Forouzanfar *et al*., 2014). Tapi pada uji antibiotik banyak menggunakan ekstrak dengan pelarut etanol, contohnya pada percobaan *strain* MRSA yang dihambat *N. sativa*, dalam percobaan *strain* MRSA terbukti lebih efektif menggunakan ekstrak dengan pelarut etanol dengan konsentrasi 4 mg / disc dan MIC-nya berkisaran 0,2-0,5 mg / mL. Lalu pada ekstrak dengan pelarut air diketahui MIC 100 mg/ml efektif untuk menghambat *Pseudomonas aeruginosa* dengan zona hambat 20 mm, dan *Streptococcus pyogenes* dengan zona hambat 15 mm (Forouzanfar *et al*., 2014; Paraakh., 2010).

2.4. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu cara untuk penyarian zat zat tertentu dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Tujuan ekstraksi ini untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi dilakukan dengan prinsip peprindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987; Dirjen POM 1986).

2. 5. Jenis-jenis ekstraksi

Dasar pemilihan metode ekstraksi dilihat dari polaritas senyawa yang akan diekstrak, metode ekstraksi ada beberapa macam :

1. Maserasi

Cara maserasi adalah ektraksi yang sederhana dilakukan dengan mencampurkan bahan yang telah dihaluskan dan bahan pelarut ekstraksi. Metode ini bertujuan agar ada keseimbangan konsentrasi simplisia yang lebih cepat ke dalam carian, walaupun metode maserasi ini memakan waktu cukup lama serta hasilnya kurang sempurna (Sudjadi, 1988).

2. Sokletasi

Pada ekstraksi ini merupakan jenis ektraksi panas karena menggunakan panas sesuai titik didih pelarut yang dipakai. Prinsipnya adalah penguapan pelarut yang diletakkan di labu yang dipanaskan. Kemudian uap bergerak melalui pipa samping alat soket dan saat melalui kondensor terjadi pendinginan. Proses ini terjadi terus menerus hingga sesuai dengan keinginan peneliti. (Harbone, 1987; Dirjen POM 1986).

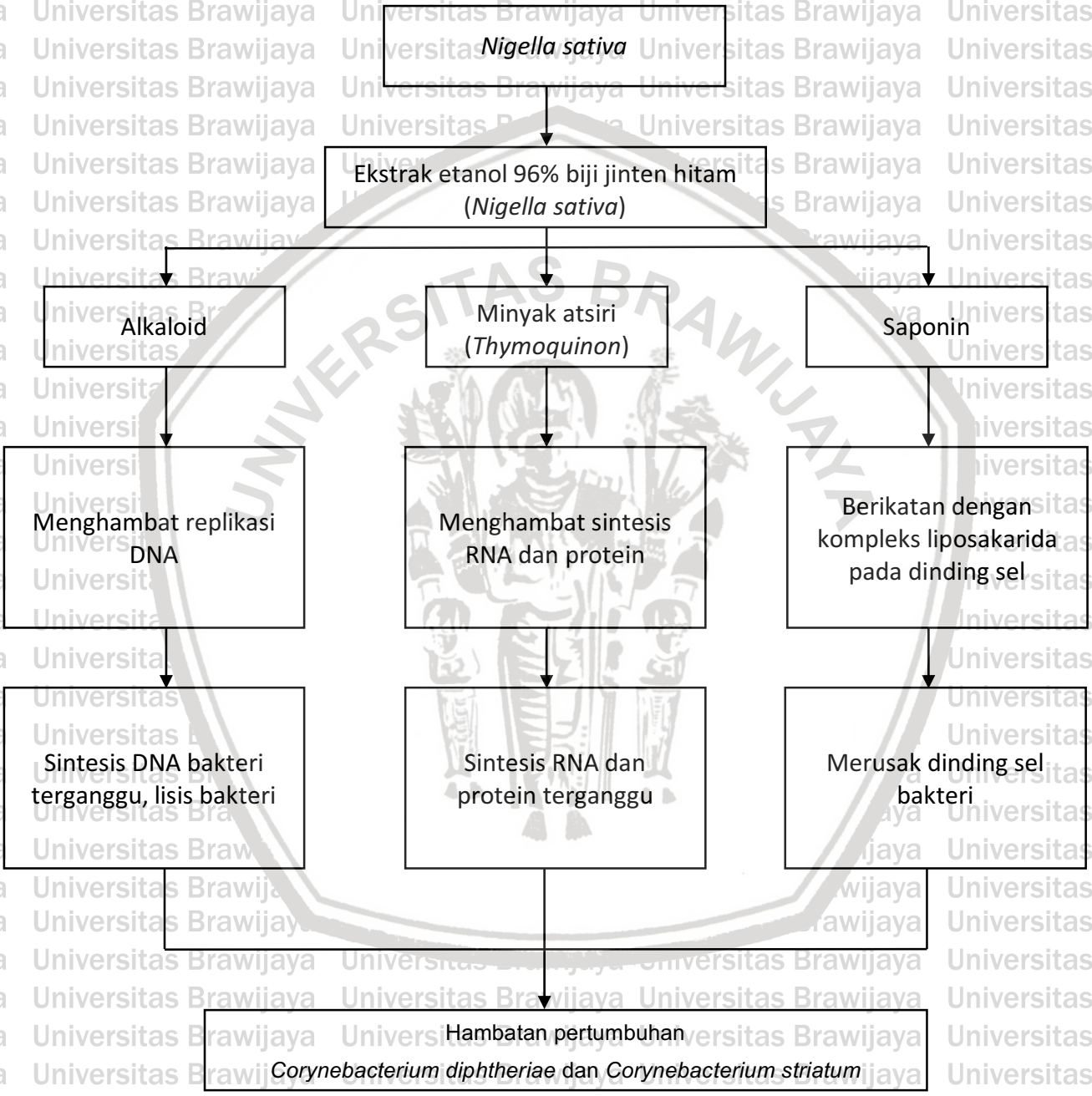
3. Perlokasi

Metode ini dilakukan dengan cara mencampur bagian simplisia ke dalam pelarut. Keuntungan dari metode ini adalah tidak memerlukan sampel padat yang telah terpisah dari ekstrak. (Sutriani L, 2008).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3.1 kerangka konsep

Biji *Nigella sativa* mempunyai banyak efek farmakologis, salah satunya efek antibiotik. Kandungan dari biji *Nigella sativa* yang utamanya berperan pada antimikro adalah kandungan alkaloid, saponin dan minyak atsiri atau volatile oil. Alkaloid pada biji *Nigella sativa* terdiri dari 2 jenis, *isoquinolin* dan *pyrazol* alkaloid. Memiliki mekanisme kerja berikatan dengan DNA sel, alkaloid bereaksi dengan senyawa asam amino penyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Berakibat terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino bakteri karena sebagian besar asam amino telah beraksi dengan gugus basa dari senyawa alkaloid. Sehingga dari perubahan susunan rantai asam amino pada DNA berakibat perubahan pada keseimbangan genetik pada asam amino DNA sehingga DNA bakteri akan rusak. Kerusakan pada DNA inti sel bakteri akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel bakteri. Dengan demikian bakteri akan menjadi inaktif dan lisis (Asniyah,2009). Saponin memberikan efek antibiotik dengan membentuk kompleks polisakarida pada dinding sel bakteri, interaksi saponin dengan dinding sel akan menyebabkan dinding dan membrane sel rusak sehingga terjadi lisis bakteri (Asniyah,2009).

Minyak atsiri mengandung beberapa senyawa penting seperti: *thymoquinone* (30-48%), *thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymene* (7 -15%), *carvacrol* (6 -12%), *4-terpineol* (2-7%), *t -anetol* (1% -4%), *sesquiterpene longifolene* (1% -8%) *α-pinene dan thymoletc* (Ahmad *et al*., 2013). Dan paling banyak adalah kandungan *thymoquinone* yang juga berkerja sebagai zat aktif utama anti mikroba. Diduga berperan dalam membentuk komplek yang irreversibel dengan asam amino nukleofilik pada protein bakteri, sehingga menyebabkan inaktivasi protein berakibat sintesis RNA dan protein sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Asniyah,2009).

3.2. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu biji *Nigella sativa* memiliki efek antibiotik terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian kali ini mengunakan eksperimental laboratorik dengan *post test only*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek antibiotik berbagai konsentrasi ekstrak biji jinten hitam *(NIgella sativa)* terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*. Proses pengekstrakan Biji Jinten Hitam *(Nigella sativa)* menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Uji antibiotik dilakukan dengan metode difusi sumuran. Metode difusi sumburan menggunakan ekstrak biji jinten hitam ini terhadap biakan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum.* penelitian inidilakukan dengan tujuh kelompok perlakuan dengan lima kali pengulangan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Januari-Februari 2018

4.2.2 Tampat Penelitian

Peneltian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah ekstrak biji *Nigella sativa* yang didapatkan dari Balai Materia Medika Kota Batu dan diekstraksi dengan metode maserasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan menggunakan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang dikembangbiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pada penelitian ini, Banyaknya pengulangan yang dilakukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus Notobroto (2005):

$P(n-1) \geq 15$

Pada penelitian ini, menggunakan 7 konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* yang berbeda serta masing-masing 1 dari kontrol positif dan kontrol negative, sehingga didapatkan :

$7(n-1) \geq 15$

$7n - 7 \geq 15$

$7n \geq 22$

$N \geq 3,24 = 5$

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan

Jadi pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali pada masing-masing perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak biji *Nigella sativa* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 0%. Sebelum dilakukan penelitian definitif, dilakukan penelitian pendahuluan menggunakan ekstrak biji jinten hitam (*Nigella Sativa).*

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

4.5 Definisi Operasional

1. Biji *Nigella sativa* yang digunakan pada penelitian ini adalah biji yang didapat dari Balai Materia Medika Kota Batu.
2. Ekstrak biji jinten hitam (*Nigella Sativa)* didapatkan dengan metode maserasi biji jinten hitam serbuk menggunakan etanol 96%.

3. Isolat *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari bakteri yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelumnya dilakukan tes identifikasi bakteri yang berasal dari specimen.
4. Zona hambat adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) yang diukur dengan 5 kali pengulangan. Semakin lebar zona hambat maka semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak biji *Nigella sativa*.
5. Kontrol positif adalah ekstrak biji jinten hitam 100% yang tidak dicampur dengan bakteri Corynebacterium diphtheriae dan Corynebacterium striatum.
6. Kontrol negatif adalah biakan Corynebacterium diphtheriae dan Corynebacterium striatum yang tidak dicampur dengan ekstrak biji jinten hitam yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak biji *Nigella sativa*.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Biji *Nigella sativa*

1. Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa)*
2. Neraca analitik
3. Seperangkat alat ekstraksi maserasi
4. Gelas kimia 250 ml
5. Botol timbang (cawan petri)
6. Spatula
7. Desikator
8. Penjepit cawan petri
9. Timbel
10. Penangas air
11. Oven

12. Etanol 96%

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang akan digunakan adalah menggunakan proses:

1. Pewarnaan gram

    1. Isolate bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*
    2. Kristal violet
    3. Lugol
    4. Alkohol 96%
    5. Safranin
    6. Gelas objek
    7. Kertas penghisap
    8. Mikroskop binokuler
    9. Ose
    10. Minyak emersi
    11. Air

1. Pewarnaan Neisser

    1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
    2. Neisser AB
    3. Neisser C
    4. Kertas saring
    5. Gelas objek
    6. Ose
    7. Mikroskop binokuler
    8. Minyak emersi

2. Tes katalase

    1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
    2. Gelas objek

3. H_2O_2 3%
4. Ose
5. Pipet tetes

3. Tes uji biokimia.
   1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
   2. Medium NAP
   3. *Vitex 2 Compact*
   4. Plate
   5. Inkubator
   6. Ose

4. Tes CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar)*
   1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
   2. Medium CTBA
   3. Plate
   4. Inkubator
   5. Ose

6. Uji difusi sumuran
   1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
   2. Mikropipet
   3. Karet penghisap
   4. Inkubator
   5. Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa)*
   6. Vortex
   7. Pembenihan cair standar
   8. Bunsen
   9. Korek api
   10. Obyek glass

11. Plat kosong dan steril
12. Alat penjepit (scalpel) steril
13. Kapas
14. *Colony counter*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Biji *Nigella Sativa*

Biji Jinten hitam *(Nigella sativa)* yang sudah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan ditimbang sebanyak 500 gram.

Proses Ekstraksi dan Evaporasi:

1. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.
2. Biji Jinten Hitam *(Nigella sativa)* yang sudah dalam bentuk serbuk ditimbang menggunakan timbangan simplisia (500 gram).
3. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer 1 liter.
4. Setelah itu direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 600 ml.
5. Dikocok hingga benar-benar tercampur (± 30 menit).
6. Didiamkan selama 1 malam atau 24 jam sampai mengendap.
7. Setelah maserasi, Dilakukan penyaringan dengan corong dan kertas saring untuk memisahkan filtrate dari ampas..
8. Proses maserasi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil maserasi siap untuk di evaporasi.
9. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30º-40º terhadap meja percobaan.
10. Ambil lapisan alkohol 96% lalu masukan ke dalam labu evaporasi.
11. Isi water bath sampai penuh, lalu pasang semua alat dengan listrik dana tur suhu water bath sebesar 90º C

12. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot vakum.
13. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah menjadi kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan ekstrak 100%.

4.7.2.1 Tes Identifikasi Bakteri

4.7.2.1.1 Pewarnaan Gram

1. Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70%
2. Jarum ose dipijarkan kemudian ditunggu hingga dingin, lalu bakteri diambil dari media lalu diratakkan di atas preparat glass
3. Kaca preparat dipijarkan hingga kering
4. Larutan zat warna krista violet diteteskan sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit
5. Preparat diberikan akuades mengalir dan dikeringkan
6. Larutan Lugol diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan keringkan
7. Larutan alkohol asama diberikan selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
8. Larutan safranin diberikan selama 30 detik lalu tunggu.
9. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
10. Minyak imersi diberikan di atas kaca preparat bakteri
11. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100x

4.7.2.1.2 Pewarnaan Neisser

Prosedur pewarnaan neisser.

1. Menggenangi sediaan bakteri dengan Neisser AB selama 1 menit. Lalu buang genangan.
2. Menggenangi sediaan bakteri dengan Neisser C selama 30 detik lalu buang genangan.
3. Mengeringkan sediaan dengan kertas saring.
4. Melihat sediaan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 x dengan bantuan minyak emersi.

4.7.2.1.3 Tes Katalase

Tes katalase dilakukan dengan menyediakan pembenihan cair bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* pada gelas obyek. Letakkan 1-2 tetes 10% atau 30%larutan H_2O_2 tambahkan 1 ose atau 2-3 tetes suspensi isolat bakteri. Amati, katalase positif ditandai oleh pembentukan buih seketika. Hasil untuk *C. diphtheriae* dan *C. striatum* adalah ada gelembung artinya tes katalase positif.

4.7.2.1.4 Uji Biokimia

Uji biokimia akan dilakukan dengan menggunakan alat *Vitek 2 compact* yang merupakan alat pemeriksaan mikrobiologik otomatik tertentu untuk identifikasi bakteri dan uji kepekaan antibiotik.

Prosedur uji biokimia :

1. Mengambil koloni bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* dari nutrient agar.
2. Koloni bakteri dilarutkan ke dalam 3 mL larutan NaCl 0,45% pH 4,5.
3. Homogenisasi hingga terbentuk suspensi sesuai bakuan McFarland 0,5-0,63 yang diukur dengan *Vitek 2 compact*.
4. Gram positif card dimasukan dalam tabung suspensi dan diletakkan dalam cassete, masukkan ke *Vitek 2 compact*.
5. Hasil identifikasi akan didapatkan setelah inkubasi 2-8 jam.

4.7.2.1.5 CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar)*

Prosedur CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar) :*

1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* di kultur pada medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar)* dan dilakukan duplo.
2. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37ºC.
3. Lalu lakukan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* di medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar)*. Koloni *C. diphtheriae* dan *C. striatum* bulat kering yang berwarna hitam-keabuan. Jika tidak ada pertumbuhan, artinya bakteri tersebut terhambat pada medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar)*.

4.7.2.2 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri

1. Ambil beberapa koloni *C. diphtheriae* dan *C. striatum* di medium agar dengan menggunakan ose.
2. Masukkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth*, kemudian inkubasi selama 18-24 jam.
3. Melakukan pengukuran absorbansi larutan standard McFarland 0,5 diukur Optical Density (OD) = 0,1 dengan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm. Berdasarkan pengukuran, nilai absorbansi arutan standard McFarland 0,5 setara dengan jumlah bakteri 1,5x CFU/ml (Tortora et al., 2007).
4. Untuk mendapatkan kosentrasi bakteri sebesar $1x10^8$ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1, dilakukan pengenceran menggunakan rumus:

$$N^1 \times V^1 = N^2 \times V^2$$

Keterangan :

N^1 : Hasil spektrofotometri

V^1 : Volume bakteri yang akan ditambahi pengencer

N^2 : OD (0,1 setara dengan 10^8)

V^2 : Volume suspense bakteri uji

- **Prosedur Difusi sumuran :**

1. Sediakan 10 cawan petri, 5 untuk uji difusi sumuran *C. diphtheriae* dan 5 lainnya untuk *C. striatum*.
2. Tuangkan suspensi bakteri *C. diphtheria* dan *C. striatum* 10^8 CFU/ml pada tiap cawan petri ± 0,5 ml.
3. Tuangkan media hangat pada cawan petri yang telah diberi suspensi bakteri uji ± 15 ml. Biarkan media memadat dan membentuk agar.
4. Pada setiap media yang telah diinokulasi bakteri dibuat 7 lubang sumuran pada masing-masing cawan petri. Beri label nama bakteri, besarnya konsentrasi dan nomer cawan petri ke-1, ke-2, dst.
5. Pada masing-masing sumuran diberikan 5 µL ekstrak dengan berbagai konsentrasi yang berbeda (0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%).
6. Media yang sudah diberi perlakuan dimasukkan ke inkubator dengan suhu 37ºC selama 24 jam.
7. Setelah itu dilakukan pengukuran dan pengamatan zona hambat, yaitu daerah jernih dekat sumuran. Selanjutnya hitung diameter zona hambat dengan jangka sorong.

4.7.2.3 Pengujian Efektifitas Antibiotik

Untuk pengujian Efektifitas anti mikroba disediakan 10 cawan petri. Disediakan pula larutan bakteri uji (*Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*) yang kemudian dicampur dengan bahan media BAP.

1. Pada uji pendahuluan masing-masing cawan petri yang telah dicampurkan suspensi bakteri dan 15 ml medium BAP kemudian dilubangi. Pada masing-masing

lubang diberi ekstrak Biji Jinten Hitam dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 0%. Sehingga didapatkan konsentrasi akhir sebesar 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 0% sebagai konsentrasi pada penelitiaan ini dengan pengulangan sebanyak lima kali.

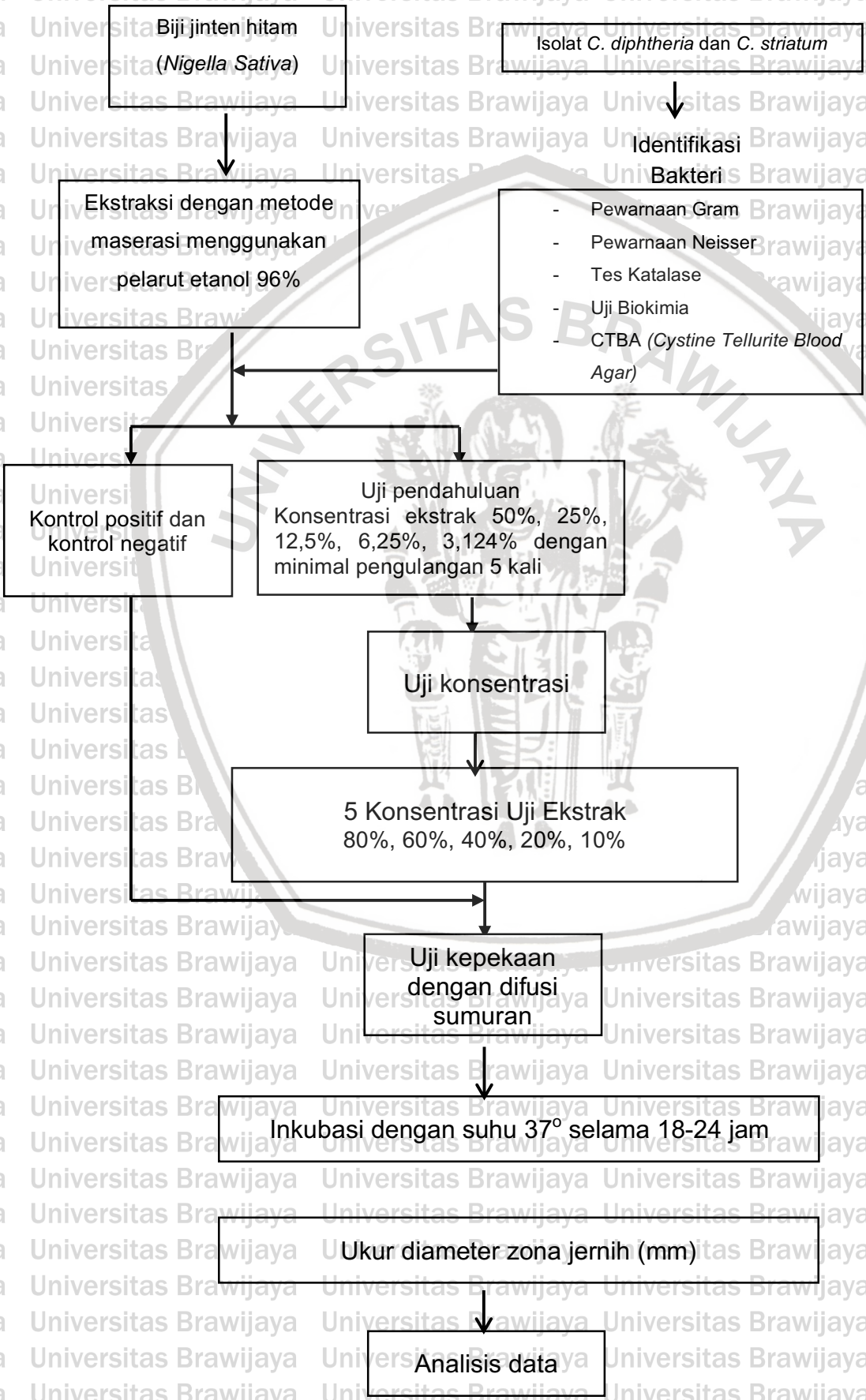
2. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 24 jam. Periksalah zona hambat pada masing-masing konsentasi di tiap cawan petri. Perhatikan dan catat diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm).

4.8 Analisis Data

Analisis yang digunakan pada penelitian ini menggunakan program SPSS (Statistic Product of Service Solution) versi 20. Langkah-langkah analisis data pada penelitian ini terdiri dari:

1. Uji normalitas data menggunakan Kolmogorov Smirnov Test untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik).
2. Uji homogenitas menggunakan Levene Test untuk melihat varian data apakah data homogen atau tidak.
3. Uji ANOVA (parametrik) dan Kruskal Wallis (nonparametrik) untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi pemberian ekstrak Biji Jinten.
4. Uji Mann-Whitney dilakukan untuk melihat pasangan kelompok yang memberikan perbedaan signifikan.
5. Uji korelasi pearson untuk mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak Biji Jinten Hitam dan efeknya.

4.9 Rencana Operasional



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5. 1 Hasil penelitian

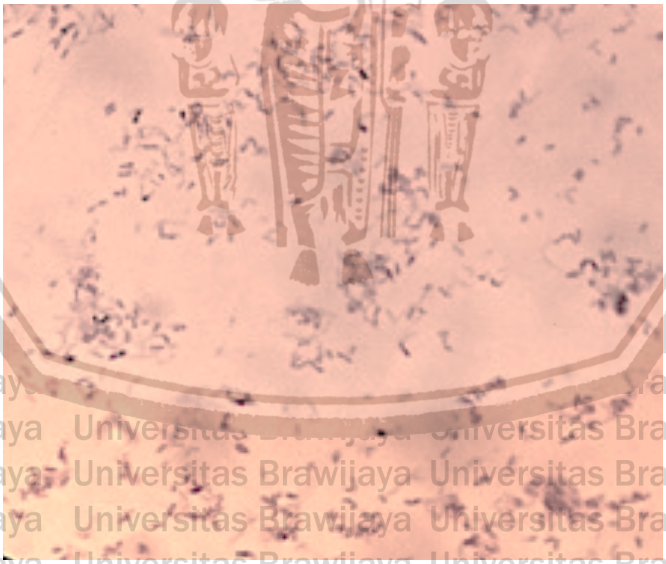
5.1.1 Identifikasi Bakteri

Bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dan telah identifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Proses identifikasi terdiri dari uji perwarnaan Gram, pewarnaan Neisser, uji Katalase, uji biokimia.

5.1.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram pada bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* menunjukan hasil basil Gram positif berbentuk V shape, dapat dilihat pada dua gambar yang telah ditandai di bawah ini.



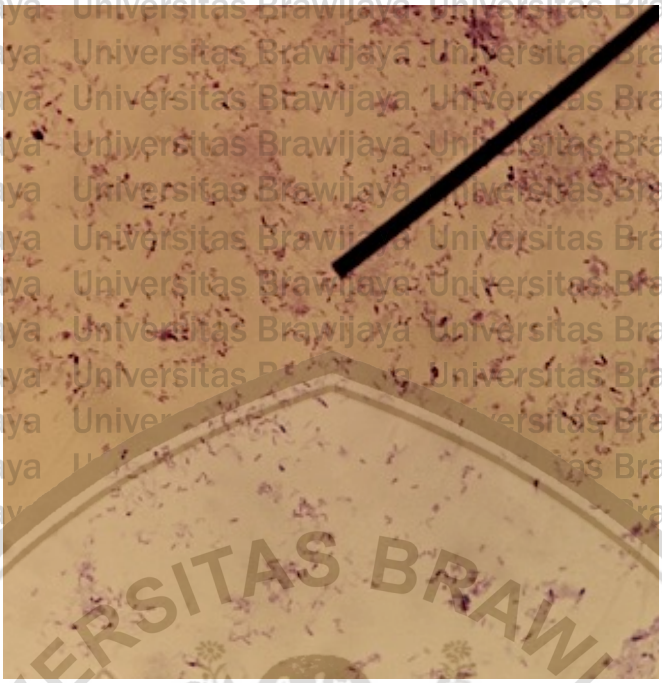
Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

Area yang ditandai pada gambar 5.1 menunjukan bahwa bakteri *Corynebacterium diphtheriae* merupakan Gram positif yang ditandai dengan basil berwarna ungu. Basil berwarna ungu menunjukkan hasil sebagai Gram positif.

Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Corynebacterium striatum*

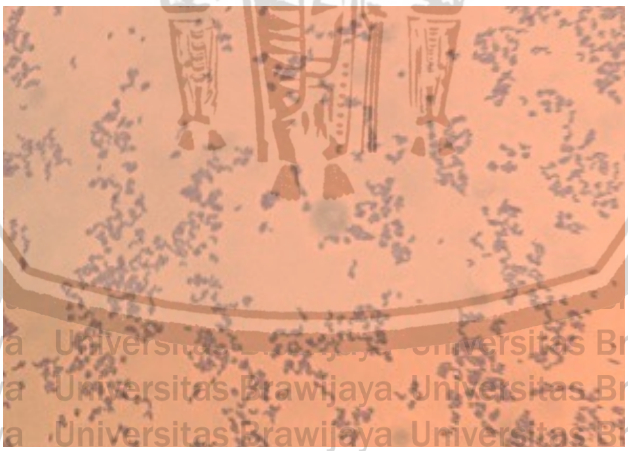
Pada gambar 5.2 menunjukan bakteri *Corynebacterium striatum* yang merupakan Gram positif basil berwarna ungu. Tetapi basil bakteri *Corynebacterium striatum* terlihat lebih pendek dari bakteri *Corynebacterium diphtheriae*.

5.1.1.2 Pewarnaan Neisser



Gambar 5.3 Hasil Pewarnaan Neisser Bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

Pada gambar 5.3 ditemukan bakteri berbentuk batang warna ungu dengan bentukan *metacromatic granule*.



Gambar 5.4 Hasil Pewarnaan Neisser Bakteri *Corynebacterium striatum*

Pada gambar 5.4 ditemukan bakteri berbentuk batang warna ungu dan karena *Corynebacterium striatum* termasuk golongan *Non diphtheriae Corynebacterium* sehingga tidak terlihat bentukan *metacromatic granule*.

1.1.1.3 Uji Katalase

Hasil uji katalase pada bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* terlihat gelembung udara atau buih yang artinya hasil uji katalase positif. Gelembung udara atau buih terbentuk setelah koloni bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* ditetesi hidrogen peroksida. Gelembung udara atau buih dapat terjadi karena pemecahan ikatan hidrogen peroksida pada koloni bakteri yang menunjukan bahwa *C. diphtheriae* dan *C. striatum* membentuk enzim katalase. Hasil uji katalase dapat di lihat pada gambar 5.5 dengan kotak berwarna biru bakteri *C. diphtheriae* dan merah bakteri *C. striatum*.

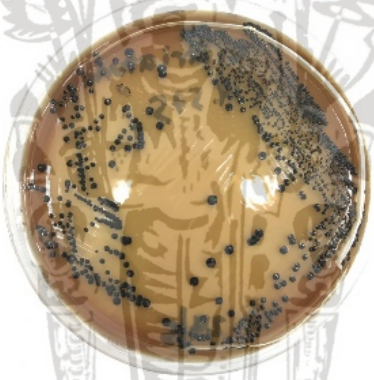
Gambar 5.5 Hasil Uji Katalase Bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*

Hasil uji katalase pada bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* terlihat gelembung udara atau buih yang artinya hasil uji katalase positif.

5.1.1.4 Kultur bakteri pada CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar)

Hasil Kultur CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar) pada bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* pada gambar dibawah :

Gambar 5.6 Hasil Kultur bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar)



Gambar 5.7 Hasil Kultur bakteri *Corynebacterium striatum* pada CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar)

Terlihat koloni pada bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* terlihat berwarna hitam gelap berbentung cembung, sirkuler, berwarna hitam gelap.

5.1.1.5 Uji biokimia

RS Dr SYAIFUL ANWAR MALANG

bioMerieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Jan 22, 2015 08:00 ICT

Patient Name:
Location:
Lab ID: atcc
Patient ID:
Physician:
Isolate Number: 1

Selected Organism : Corynebacterium diphtheriae

Source:
Collected:

Comments:	

Identification Information			
Selected Organism	Analysis Time:	6.00 hours	Status:
Organism Quantity:	99% Probability	Corynebacterium diphtheriae	
ID Analysis Messages	Bionumber:	6363000410001	

Biochemical Details

4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	+	7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	+	15	APPA	(+)	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	-	41	AARA	-	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	+
51	MTE	+	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	?									

Gambar 5.8 Hasil Uji Biokimia Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* menggunakan vitek 2

Hasil uji biokimia menggunakan vitek 2 menunjukan bahwa kemungkinan 99% bakteri yang diuji adalah *Corynebacterium diphtheriae.*

RS dr SYAIFUL ANWAR MALANG

bioMerieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Mar 8, 2017 10:54 CST

Patient Name: SURONO
Location:
Lab ID: 07032017.3897

Patient ID: 3897
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Corynebacterium striatum

Source: KA

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	6.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	95% Probability	Corynebacterium striatum		
ID Analysis Messages	Bionumber:	7303000400001		

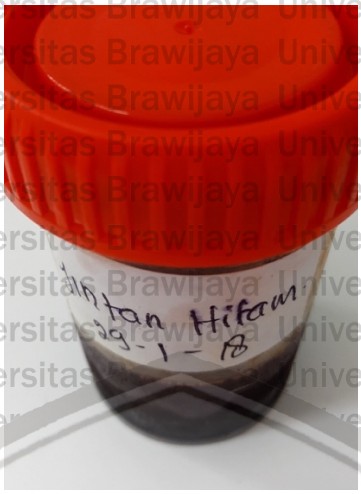
Biochemical Details

4	dGAL	+	5	LeuA	+	6	ELLM	+	7	PheA	(+)	8	ProA	+	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	-	41	AARA	-	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	+
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	?									

Gambar 5.9 Hasil Uji Biokimia Bakteri *Corynebacterium striatum* menggunakan vitek 2

Hasil uji biokimia menggunakan vitek 2 menunjukan bahwa kemungkinan 95% bakteri yang diuji adalah *Corynebacterium striatum.*

5.1.1.6 Hasil Ektrak Biji *Nigella Sativa*



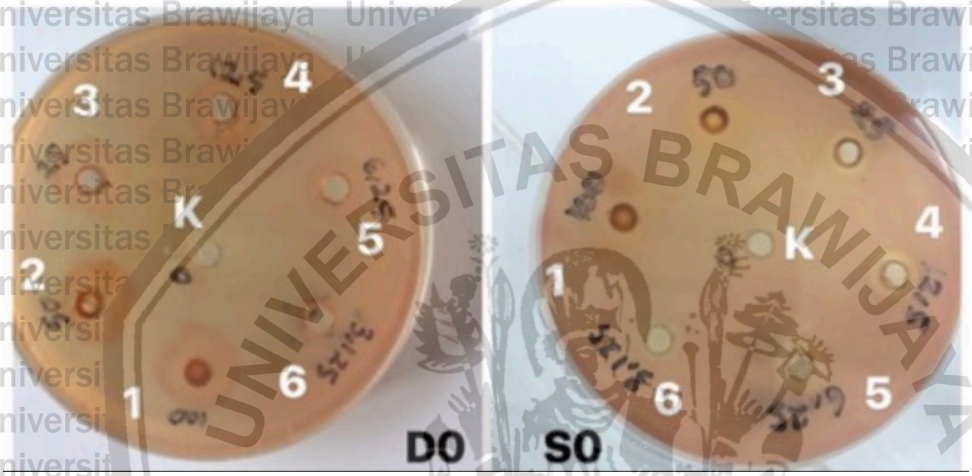
Gambar 5.10 Ektrak Biji *Nigella Sativa*

5.1.1.7 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* yang akan digunakan pada penelitian difusi sumuran yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Hasil dapat di lihat pada gambar 5.10. Daya antibiotik ditandai dengan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri di sekeliling sumuran. Penelitian pendahuluan pada kedua bakteri bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* menunjukan semua konsentrasi menghasilkan zona hambat tetapi zona hambat paling maksimal dihasilkan pada konsentrasi 100% dan 50%. Selanjutnya untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%.

5.1.1.8 Hasil Penelitian Inti dengan Metode Difusi Sumuran

Penentuan zona hambat menggunakan difusi sumuran pada penelitian ini dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri yang ada disekeliling sumuran. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur dengan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* yang digunakan 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5.11 dan 5.12.



Gambar 5.11 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Keterangan gambar:

D0 : Uji Pendahuluan Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*

S0 : Uji Pendahuluan Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum*.

Keterangan gambar D0:

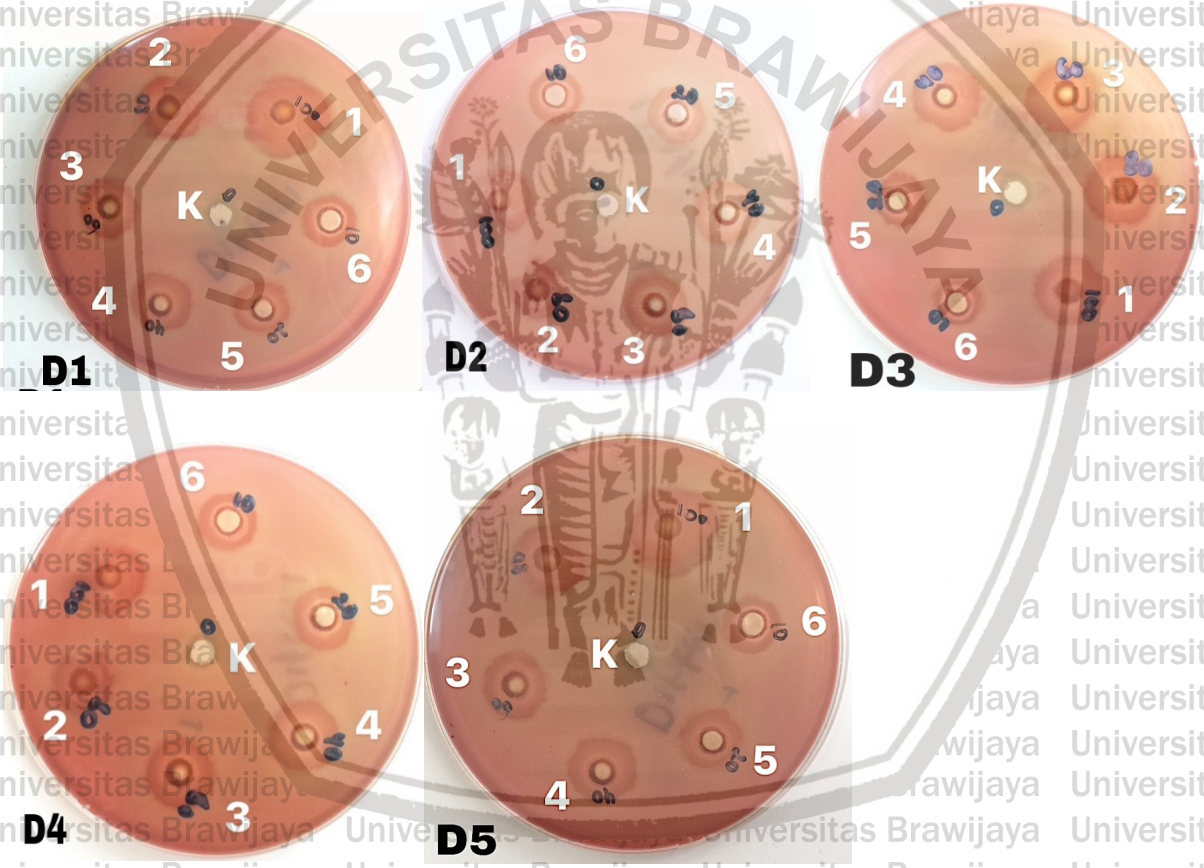
1. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
2. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 50% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
3. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella sativa* 25% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
4. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella sativa* 12,5% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
5. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 6,25% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
6. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 3,125% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

k. Kontrol Negatif (Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 0%) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

Keterangan gambar S0:

1. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
2. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 50% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
3. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 25% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
4. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 12,5% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
5. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 6,25% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
6. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 3,125% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*

k. Kontrol Negatif (Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 0%) pada bakteri *Corynebacterium striatum.*



Gambar 5.12 Hasil Penelitian Inti dengan Metode Difusi Sumuran Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*

Keterangan gambar:

1. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*
2. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 80% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*
3. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 60% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*
4. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 40% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*
5. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 20% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*
6. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 10% pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae.*

k. Kontrol Negatif (Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 0%) pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae*

D1 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* I

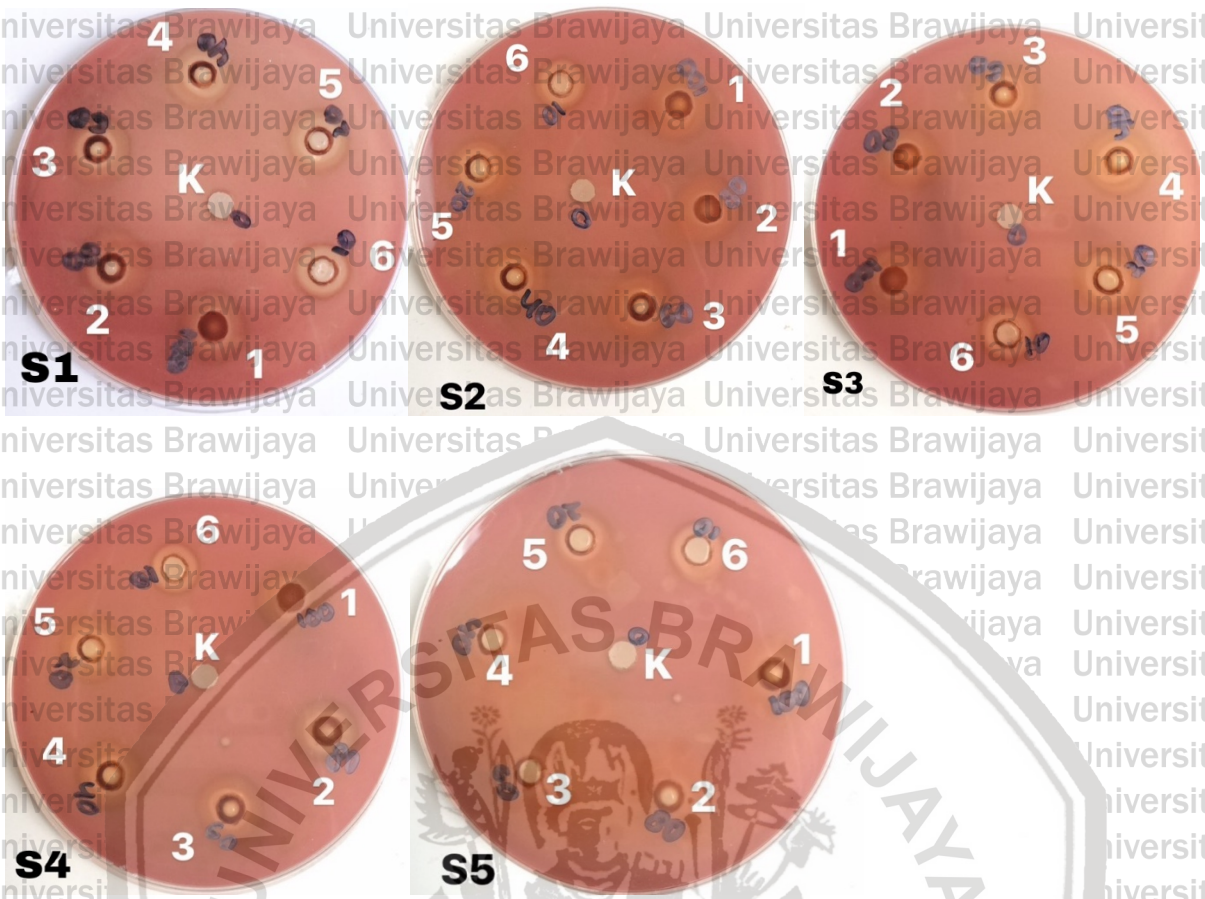
D2 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* II

D3 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* III

D4 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* IV

D5 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* V

Pada gambar hasil penelitian dapat terlihat ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Corynebacterium diphtheriae,* peningkatan konsentrasi sebanding dengan peningkatan diameter zona hambat yang terbentuk



Gambar 5.13 Hasil Penelitian Inti dengan Metode Difusi Sumuran Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10% pada bakteri *Corynebacterium striatum*.

Keterangan gambar:

1. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 100% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
2. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 80% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
3. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 60% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
4. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 40% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
5. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 20% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*
6. Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 10% pada bakteri *Corynebacterium striatum.*

k. Kontrol Negatif (Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* 0%) pada bakteri *Corynebacterium striatum.*

S1 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum* I

S2 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum* II

S3 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum* III

S4 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum* IV

S5 : Pengulangan Uji Difusi Sumuran pada bakteri *Corynebacterium striatum* V

Pada gambar hasil penelitian dapat terlihat ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Corynebacterium diphtheriae,* peningkatan konsentrasi sebanding dengan peningkatan diameter zona hambat yang terbentuk.

5.1.1.9 Hasil Pengukuran Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri

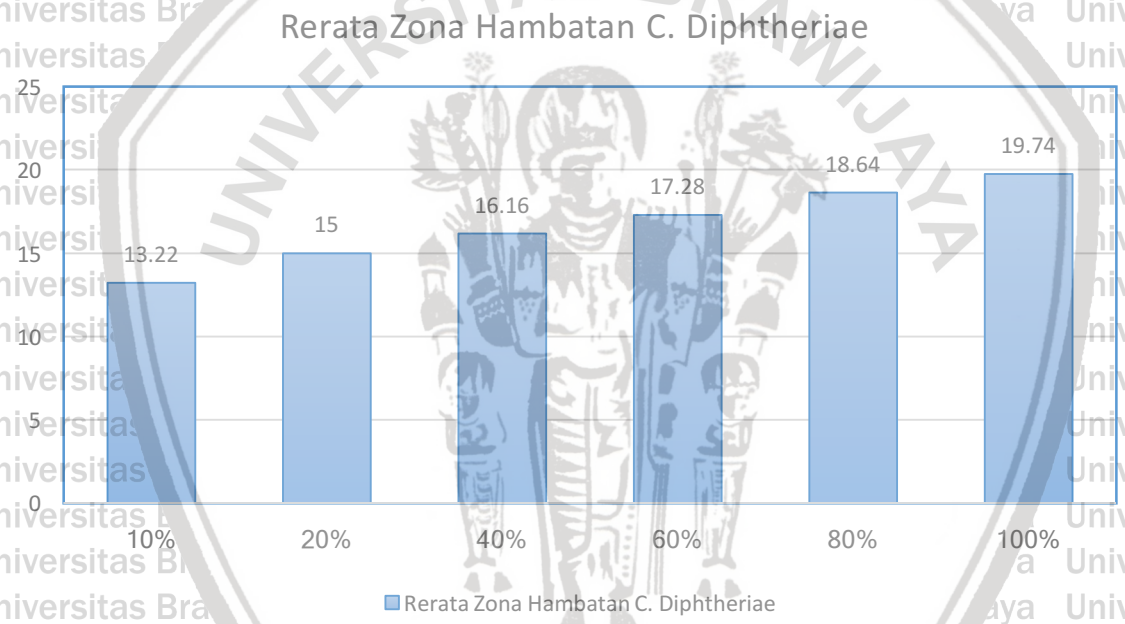
Penelitian ini menggunakan beberapa Konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* yang digunakan 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%. Efektifitas antibiotik ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap pertumbuhan kedua bakteri *Corynebacterium diphtheriae dan Corynebacterium striatum* diuji dengan metode difusi sumuran. Perbedaan Efektifitas antibiotik ditentukan dengan besar diameter zona hambat yang terbentuk pada medium BAP (*Blood Agar Plates)* yang telah dicampur dengan isolate bakteri *Corynebacterium diphtheriae dan Corynebacterium striatum.* Medium BAP kemudian dilubangi untuk membentuk sumur berdiameter 6 mm menggunakan perforator steril. Didalam lubang atau sumur ditetesi dengan ekstrak Biji *Nigella Sativa* dan dimasukan kedalam inkubator untuk di inkubasi selama 18-24 jam.

Berdasarkan hasil uji difusi sumuran didapatkan bahwa zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata diameter yang berbeda-beda. Semakin besar zona hambat yang terbentuk berarti semakin besar daya antibiotik pada ekstrak Biji *Nigella Sativa*. Hasil uji difusi sumuran diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan dapat ditentukan besar zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap pertumbuhan masing-masing bakteri *Corynebacterium diphtheriae dan Corynebacterium striatum.* Hasil perhitungan zona hambat ekstrak Biji *Nigella Sativa* disajikan pada tabel 5.1 beserta grafik 5.1 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Biji *Nigella*

Sativa bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan tabel 5.2 beserta grafik 5.2 hasil hambatan pertumbuhan bakteri *Corynebacterium striatum*.

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Ekstrak C. Diphtariae					Rerata (mm)
	Pengulangan (mm)					
	I	II	III	IV	V	
10	13,35	12,60	13,40	14,30	12,45	13,22
20	14,30	15,60	14,55	15,65	14,90	15,00
40	15,60	16,80	16,10	16,20	16,10	16,16
60	16,70	17,60	17,40	17,30	17,40	17,28
80	18,20	18,60	17,95	18,80	19,65	18,64
100	20,40	20,30	18,30	19,30	20,40	19,74

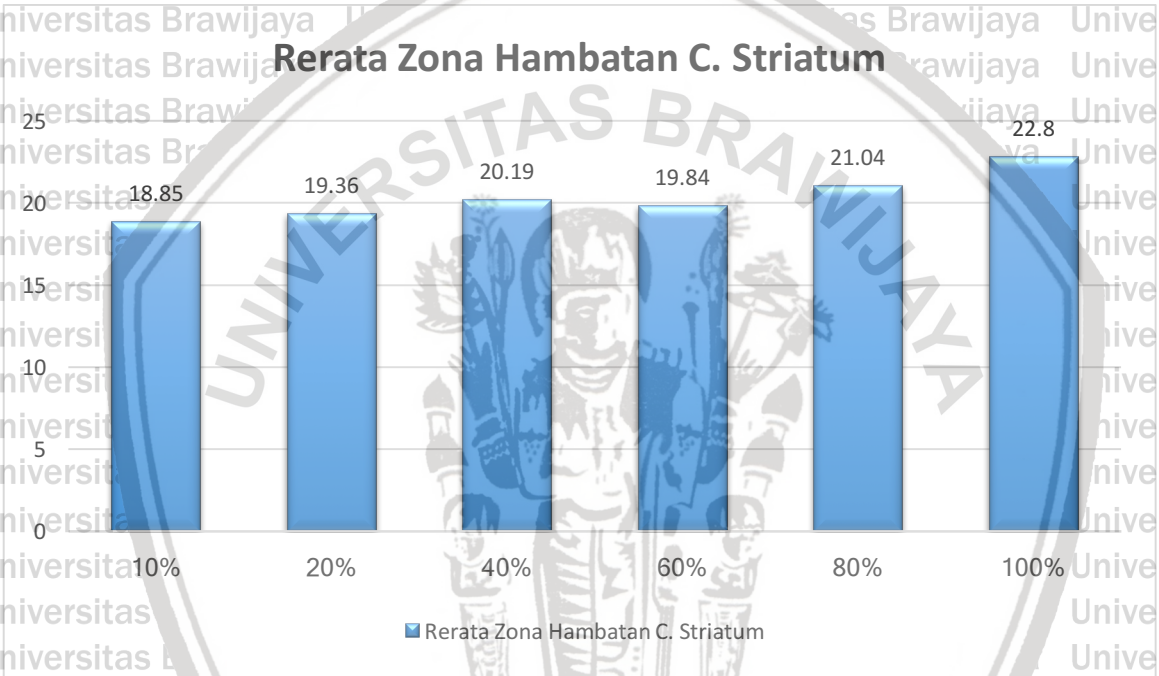
Tabel 5.1 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap *Corynebacterium diphtheriae.*



Grafik 5.1 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap *Corynebacterium diphtheriae.*

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Ekstrak C. Striatum					Rerata (mm)
	Pengulangan (mm)					
	I	II	III	IV	V	
10	18,60	18,80	19,80	18,55	18,50	18,85
20	18,90	19,40	19,95	19,15	19,40	19,36
40	19,60	20,75	20,90	19,90	19,80	20,19
60	19,90	19,40	19,60	20,10	20,20	19,84
80	20,50	20,90	21,10	21,50	21,20	21,04
100	22,90	23,60	22,80	22,10	22,60	22,80

Tabel 5.2 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap *Corynebacterium striatum.*



Grafik 5.2 Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak Biji *Nigella Sativa* terhadap *Corynebacterium striatum.*

Berdasarkan pada data tabel dapat disimpulkan bahwa bahan aktif yang terdapat dalam ekstrak biji *Nigella sativa* mempunyai potensi sebagai antibiotik terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak. Hasil penelitian tersebut kemudian dianalisis secara statistik.

5.2 ANALISIS DATA

5.2.1 Efektifitas Ekstrak Biji *Nigella sativa* Terhadap Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheria*

5.2.1.1 Uji Normalitas Data Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*

uji kenormalan data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* bertujuan untuk mengetahui normal tidaknya data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*. uji kenormalan data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dilakukan menggunakan Kolmogorov-Smirnov, dengan kriteria apabila nilai probabilitas > *level of significance* (alpha = 5%) maka data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan normal. Hasil uji normalitas data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.2 Kolmogorov Smirnov – uji Normalitas

Uji Normalitas	
Kolmogorov- Smirnov	0,361
Probabilitas	0,999

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa uji normalitas menghasilkan statistik *Kolmogorov-Smirnov* sebesar 0,361 dengan probabilitas sebesar 0,999. Hal ini dapat diketahui bahwa uji tersebut menghasilkan probabilitas > alpha (5%), sehingga data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan normal.

5.2.1.2 Uji Homogenitas Data Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*

Uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* bertujuan untuk mengetahui apakah data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* memiliki ragam yang homogen atau tidak. Ragam data tersebut homogen apabila data tersebut diambil dari populasi, kondisi laboratorium maupun perlakuan terhadap *Corynebacterium diphtheriae* tersebut homogen. uji homogen data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dilakukan menggunakan *Levene Test*, dengan kriteria apabila nilai probabilitas > *level of significance* (alpha = 5%) maka data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan homogen.

Hasil uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.3. Levene – uji Homogenitas

Uji Homogenitas	
Levene Statistic	2,050
Probabilitas	0,107

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa uji homogen data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* menghasilkan statistik *Levene* sebesar 2,050 dengan probabilitas sebesar 0,107. Hal ini dapat dikatakan bahwa uji tersebut menghasilkan probabilitas > alpha (5%), sehingga data pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan memiliki ragam yang homogen.

5.2.1.3 uji Efektifitas Ekstrak Biji *Nigella sativa* Terhadap Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* (ANOVA)

Uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dilakukan menggunakan *One Way ANOVA* dengan hipotesis berikut ini:

H0 : Tidak ada perbedaan Efektifitas yang signifikan ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*

H1 : Minimal ada satu pasang pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang berbeda signifikan

Kriteria uji menyebutkan apabila statistik uji $F \geq F_{tabel}$ atau probabilitas ≤ *level of significance* (alpha = 5%) maka H0 ditolak, sehingga dapat dinyatakan bahwa minimal ada satu pasang ekstrak biji *Nigella sativa* yang menghasilkan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang berbeda signifikan.

Hasil uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.4 Analisis Ragam (ANOVA)

Perlakuan	Jumlah Kuadrat	db	Kuadrat Tengah	F	Sig.
Ekstrak Biji *Nigella sativa*	149,447	5	29,889	58,958	0,000
Error	12,167	24	0,507		
Total	161,614	29			

Tabel di atas menginformasikan bahwa uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* menghasilkan statistik uji F sebesar 58,958 dengan probabilitas sebesar 0,000. Hal ini dapat diketahui bahwa statistik uji F > F_{tabel} (2,621) probabilitas < alpha (5%), sehingga H0 ditolak. Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa minimal ada satu pasang ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang berbeda signifikan.

Untuk mengetahui Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang berbeda signifikan dilakukan menggunakan Honest Square Difference (Tukey-HSD) dengan kriteria apabila satu pasang ekstrak biji *Nigella sativa* menghasilkan probabilitas ≤ *level of significance* (alpha = 5%) maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*. Hasil analisis perbedaan Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dapat diketahui melalui tabel berikut ini :

Tabel 5.5 Probabilitas dan Notasi LSD Test

Ekstrak biji *Nigella sativa*	Rata-Rata	Probabilitas						Notasi
		10%	20%	40%	60%	80%	100%	
10%	**13,22±0,74**		0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	A
20%	**15,00±0,61**	0,007		0,142	0,000	0,000	0,000	B
40%	**16,16±0,43**	0,000	0,142		0,168	0,000	0,000	BC
60%	**17,28±0,34**	0,000	0,000	0,168		0,058	0,000	CD
80%	**18,64±0,65**	0,000	0,000	0,000	0,058		0,077	DE
100%	**19,94±1,18**	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077		E

Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* 100% menghasilkan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan ekstrak biji *Nigella sativa* 10%, 20%, 40%, dan 60%. Namun tidak berbeda signifikan dengan ekstrak biji *Nigella sativa* 80%. Sementara ekstrak biji *Nigella sativa* 10% menghasilkan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang paling rendah dan berbeda signifikan dengan ekstrak biji *Nigella sativa* 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

5.2.1.4 Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Biji *Nigella sativa* dengan Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* (*Korelasi Pearson*)

uji hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dilakukan dengan menggunakan korelasi *Pearson* dengan hipotesis berikut ini:

H0 : Tidak ada hubungan yang signifikan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dengan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*

H1 : Ada hubungan yang signifikan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dengan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*

Analisis korelasi *Pearson* dimaksudkan untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dan ada tidaknya hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*. Konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dikatakan terhadap hubungan yang signifikan apabila *probabilitas* < *level of significance* (α).

Hasil uji tingkat keeratan hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dapat diketahui melalui ringkasan dalam tabel berikut:

Tabel 5.6 Hasil Korelasi Spearman

Variabel 1	Variabel 2	Koefisien Korelasi	Probabilitas

Konsentrasi Ekstrak Biji *Nigella sativa*	Pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*	0,951	0,000

Berdasarkan hasil uji dalam tabel menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* menghasilkan probabilitas sebesar 0,000. Hasil ini menunjukkan bahwa probabilitas < *level of significance* (α=5%). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae.* Koefisien korelasi konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* sebesar 0,951 menunjukkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan sangat kuat dan bersifat searah (positif). Hal ini berarti meningkatnya konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* diikuti oleh peningkatan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*.

5.2.2 Efektifitas Ekstrak Biji *Nigella sativa* Terhadap Pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

5.2.2.1 Uji Normalitas Data Pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

Uji normalitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* bertujuan untuk mengetahui normal tidaknya data pertumbuhan *Corynebacterium striatum*. Uji normalitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dilakukan menggunakan Kolmogorov-Smirnov, dengan kriteria apabila nilai probabilitas > *level of significance* (alpha = 5%) maka data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan normal. Hasil Uji normalitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.7 Kolmogorov Smirnov – Uji normalitas

Uji Normalitas

Kolmogorov- Smirnov	0,785
Probabilitas	0,568

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa Uji normalitas menghasilkan statistik *Kolmogorov-Smirnov* sebesar 0,785 dengan probabilitas sebesar 0,568. Hal ini dapat diketahui bahwa uji tersebut menghasilkan probabilitas > alpha (5%), sehingga data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan normal.

5.2.2.2 Uji Homogenitas Data Pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* bertujuan untuk mengetahui apakah data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* memiliki ragam yang homogen atau tidak. Ragam data tersebut homogen apabila data tersebut diambil dari populasi, kondisi laboratorium maupun perlakuan terhadap *Corynebacterium striatum* tersebut homogen. uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dilakukan menggunakan *Levene Test*, dengan kriteria apabila nilai probabilitas > *level of significance* (alpha = 5%) maka data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan homogen. Hasil uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.8 Levene – Uji homogenitas

Uji Homogenitas	
Levene Statistic	3,622
Probabilitas	0,016

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa uji homogenitas data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* menghasilkan statistik *Levene* sebesar 3,622 dengan probabilitas sebesar 0,016. Hal ini dapat dikatakan bahwa uji tersebut menghasilkan probabilitas < alpha (5%), sehingga data pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan memiliki ragam yang tidak homogen.

5.2.2.3 Uji Efektifitas Ekstrak Biji *Nigella sativa* Terhadap Pertumbuhan *Corynebacterium striatum* (Kruskal Walis)

Uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dilakukan menggunakan *Kruskal Walis* dengan hipotesis berikut ini:

H0 : Tidak ada perbedaan Efektifitas yang signifikan ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

H1 : Minimal ada satu pasang pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum* yang berbeda signifikan

Kriteria uji menyebutkan apabila statistik uji Chi Square ≥ Chi $Square_{tabel}$ atau probabilitas ≤ *level of significance* (alpha = 5%) maka H0 ditolak, sehingga dapat dinyatakan bahwa minimal ada satu pasang ekstrak biji *Nigella sativa* yang menghasilkan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* yang berbeda signifikan.

Hasil uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dapat dilihat melalui tabel berikut :

Tabel 5.9. Tabel Chi Square - Kruskal Walis

Kruskal Walis	
Chi Square	7,228
Probabilitas	0,204

Tabel di atas menginformasikan bahwa uji Efektifitas ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum* menghasilkan statistik uji Chi Square sebesar 7,228 dengan probabilitas sebesar 0,204. Hal ini dapat diketahui bahwa statistik uji Chi Square < Chi $Square_{tabel}$ (11,071) probabilitas > alpha (5%), sehingga H0 diterima. Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa tidak ada perbedaan Efektifitas yang signifikan ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum*.

5.2.2.4 Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Biji *Nigella sativa* dengan Pertumbuhan *Corynebacterium striatum* (*Korelasi Pearson*)

Uji hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dilakukan dengan menggunakan korelasi *Pearson* dengan hipotesis berikut ini:

H0 : Tidak ada hubungan yang signifikan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dengan pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

H1 : Ada hubungan yang signifikan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dengan pertumbuhan *Corynebacterium striatum*

Analisis korelasi *Pearson* dimaksudkan untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dan ada tidaknya hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum*. Konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dikatakan terhadap hubungan yang signifikan apabila *probabilitas* < *level of significance* (α).

Hasil uji tingkat keeratan hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dapat diketahui melalui ringkasan dalam tabel berikut:

Tabel 5.10 Hasil Korelasi Spearman

Variabel 1	Variabel 2	Koefisien Korelasi	Probabilitas
Konsentrasi Ekstrak Biji *Nigella sativa*	Pertumbuhan *Corynebacterium striatum*	0,217	0,277

Berdasarkan hasil uji dalam tabel menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* menghasilkan probabilitas sebesar 0,277. Hasil ini menunjukkan bahwa probabilitas > *level of significance* (α=5%). Dengan demikian

dapat dinyatakan bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum.* Koefisien korelasi konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* sebesar 0,217 menunjukkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan lemah dan bersifat searah (positif). Hal ini berarti meningkatnya konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* diikuti oleh peningkatan pertumbuhan *Corynebacterium striatum*.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah biji *Nigella sativa* efektif dalam menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum.* Pada penelitian ini menggunakan 2 jenis bakteri karena walaupun kedua bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* memiliki toksonomi yang sama tetapi tujuan dari penelitian ini untuk melihat pembandingan zona hambat yang terbentuk menggunakan satu ekstrak yang sama pada 2 bakteri dengan *famili* yang sama. Walaupun *Corynebacterium sp* memiliki banyak jenis tetapi kedua bakteri ini merupakan bakteri paling spesifik patogen dibanding *Corynebacterium sp.* yang lain meski begitu belum ada pedoman untuk tatalaksana terapi.

Bahan ekstrak yang digunakan adalah biji *Nigella sativa.* Pengekstraksian dilakukan dengan metode maserasi biji *Nigella sativa* serbuk menggunakan etanol 96%. Pemilihan metode ektraksi dengan maserasi karena proses dan alat pembuatannya tidak susah, waktu ekstraksinya cepat dan relatif lebih murah. Beberapa senyawa aktif yang didapat dari ekstrak biji *Nigella sativa* menggunakan etanol 96% yaitu alkaloid, saponin dan minyak atsiri atau volatile oil. Isolat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Sebelum penelitian, dilakukan uji identifikasi dari bakteri untuk memastikan bahwa bakteri yang ada sama dengan bakteri yang diinginkan. Uji identifikasi yang digunakan meliputi pemeriksaan Gram, pemeriksaan Neisser, uji katalase, penanaman CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar), dan uji biokimia. Pada pemeriksaan Gram didapatkan basil berwarna ungu pada kedua bakteri, yang menunjukkan hasil sebagai bakteri gram positif. Pada pemeriksaan Neisser didapatkan granul dan batang warna ungu. Pada uji katalase didapatkan hasil positif pada kedua bakteri ditandai dengan temuan gelembung atau buih. Pada penanaman CTBA (Cystine Tellurite Blood Agar), hasil menunjukan pada pertumbuhan koloni

terlihat berwarna hitam gelap. Lalu, uji biokimia menunjukan bahwa kemungkinan bakteri yang di uji adalah *Corynebacterium diphtheriae* sebesar 99% dan *Corynebacterium striatum* sebesar 95%.

Setelah uji identifikasi selesai penelitian dilanjutkan dengan uji pendahuluan untuk *tube dilution* untuk melihat apakah penelitian ekstraksi biji *Nigella sativa* dengan metode *tube dilution* dapat dilanjutkan atau tidak. Akan tetapi setelah diuji pendahuluan dengan *tube dilution* didapatkan larutan keruh sehingga penelitian diganti dengan metode lain yaitu difusi sumuran.

Untuk mengetahui Efektifitas biji *Nigella sativa* dalam menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dengan metode difusi sumuran dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu dengan medium BAP (*blood tellurite agar)* yang dibuat dalam beberapa konsentrasi ekstrak. Hal ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* yang akan digunakan pada penelitian difusi sumuran, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Penelitian pendahuluan pada kedua bakteri bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* menunjukan bahwa semua konsentrasi menghasilkan zona hambat tetapi zona hambat paling maksimal dihasilkan pada konsentrasi 100% dan 50%.

Selanjutnya, untuk penelitian inti, konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* yang digunakan adalah 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 10%. Berdasarkan hasil uji difusi sumuran didapatkan bahwa zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata diameter yang berbeda-beda. Semakin besar zona hambat yang terbentuk berarti semakin besar daya antibiotik pada ekstrak biji *Nigella Sativa*.

Pada ekstrak biji *Nigella sativa* didapatkan senyawa aktif yaitu alkaloid, saponin dan minyak atsiri atau volatile oil**.** Saponin memberikan efek antibiotik dengan membentuk kompleks polisakarida pada dinding sel bakteri, interaksi saponin dengan dinding sel akan menyebabkan dinding dan membrane sel rusak sehingga dapat terjadi lisis bakteri (Asniyah,2009).

Kandungan kedua yaitu, minyak atsiri mengandung beberapa senyawa penting tetapi yang paling banyak adalah kandungan *thymoquinone* yang berkerja sebagai zat aktif utama

anti mikroba. Diduga berperan dalam membentuk komplek irreversibel dengan asam amino nukleofilik pada protein bakteri, sehingga menyebabkan inaktivasi protein berakibat sintesis RNA dan protein sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Asniyah,2009).

Kandungan ketiga, yaitu alkaloid pada biji *Nigella sativa* terdiri dari 2 jenis, *isoquinolin* dan *pyrazol* alkaloid. Memiliki mekanisme kerja berikatan dengan DNA sel, alkaloid bereaksi dengan senyawa asam amino penyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Sehingga terjadi perubahan pada keseimbangan genetik pada asam amino DNA yang menimbulkan kerusakan DNA bakteri dan terjadi lisis pada inti sel bakteri (Asniyah,2009). Penelitian Immanuel, dkk pada tahun 2013 juga meneliti tentang kandungan alkaloid yang ada pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) sebagai antibiotik terhadap beberapa bakteri termasuk diantaranya adalah *C. diphtheriae* dengan metode difusi cakram. Hasil penelitian tersebut menunjukan bahwa senyawa aktif alkaloid dapat menghambat pertumbuhan *C. diphtheriae* dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga dinding sel bakteri tersebut lisis secara sempurna.

Ada pula sebuah jurnal review oleh Forouzanfar F, dkk pada tahun 2014, yang membahas tentang potensi terapi dari *Nigella sativa*. Berdasarkan jurnal tersebut, ekstrak biji *Nigella sativa* terbukti memiliki potensi sebagai antibiotik, antifungal, antivirus, bahkan juga anti-kanker. Pada jurnal tersebut, disebutkan bahwa ekstrak *Nigella sativa* sebagai antibiotik telah terbukti secara in vitro dan in vivo. Secara in vitro, dikatakan ekstrak *Nigella sativa*, terutama kandungan *thymoquinone* (TQ) pada minyak atsiri, memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri, terutama gram positif, seperti *Staphylococcus aureus.* Secara in vivo, dimana ekstrak tersebut diuji cobakan pada tikus, dan hasilnya menunjukkan bahwa *essential oil* pada ekstrak *Nigella sativa* mampu menghambat bakteri gram positif dan gram negatif.

Berikutnya, hasil penelitian *Corynebacterium striatum* pada penelitian ini menunjukkan *Nigella sativa* terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri, karena adanya beberapa kandungan senyawa aktif, salah satunya saponin. Hasil penelitian ini juga didukung pada penelitian Muhammad GM, tahun 2017, yang meneliti tentang ekstrak etanol bawang putih

(*Allium sativum*) dengan metode difusi cakram, dimana terbukti bahwa salah satu senyawa aktifnya, yaitu saponin, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *C. striatum*.

Uji normalitas dan uji homogenitas pada *Corynebacterium diphtheriae* digunakan sebagai syarat untuk menentukan uji parametrik atau non parametrik. Apabila Uji normalitas dan uji homogenitas dianggap signifikan maka menggunakan uji parametrik salah satunya uji one-way ANOVA yaitu untuk mengetahui apakah sampel data yang digunakan berdistribusi normal dan homogen. Hasil kedua uji tersebut menunjukkan bahwa sampel berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji statistik parametrik. Berdasarkan hasil uji One-way ANOVA didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p< 0,05$). Hasil ini ditunjang dengan Honest Square Difference (Tukey-HSD) untuk mengetahui efek ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang berbeda signifikan. Hasil analisis menunjukan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* 100% menghasilkan hambatan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan ekstrak biji *Nigella sativa* 10%, 20%, 40%, dan 60%. Namun tidak berbeda signifikan dengan ekstrak biji *Nigella sativa* 80%.

Uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dan ada tidaknya hubungan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae.* Berdasarkan hasil Uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* menghasilkan probabilitas sebesar 0,000. Hasil ini menunjukkan bahwa probabilitas < *level of significance* (α=5%). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae.* Koefisien korelasi konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* sebesar 0,951 menunjukkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dinyatakan sangat kuat dan bersifat searah (positif).

Sedangan pada bakteri *Corynebactrium striatum* pada uji normalitas dinyatakan normal dan uji homogenitas dinyatakan tidak homogen. Karena syarat penggunaan uji One-way ANOVA tidak terpenuhi sehingga menggunakan uji statistik Kruskal walis. Dari hasil statistik uji Chi Square sebesar 7,228 dengan probabilitas sebesar 0,204. Hal ini dapat diketahui bahwa statistik uji Chi Square < Chi $Square_{tabel}$ (11,071) probabilitas > alpha (5%), sehingga dapat dinyatakan bahwa tidak ada perbedaan efek yang signifikan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium striatum*.

Untuk uji Korelasi pearson menunjukan hasil Koefisien korelasi konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* sebesar 0,217 menunjukkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dan pertumbuhan *Corynebacterium striatum* dinyatakan lemah dan bersifat searah (positif).

Kesimpulannya, biji *Nigella sativa* efektif menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dilihat dari peningkatan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri tersebut terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi perlakuan dan secara statistik mempunya nilai bermakna yang tinggi. Pada *Corynebacterium striatum* efektif menghambat pertumbuhan meski pun tidak ada perbedaan efek yang signifikan pada pemberian konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa* dalam hambat pertumbuhan *Corynebacterium striatum*. Sehingga hipotesis penelitian yang menyatakan "Hipotesis pada penelitian ini yaitu biji *Nigella sativa* memiliki efek antibiotik terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum"* diterima.

Keterbatasan dari penelitian ini, karena memiliki keterbatasan waktu, biaya, dan pada penelitian ini hanya menggunakan satu jenis metode, yaitu metode difusi sumuran, yang digunakan hanya untuk melihat zona hambat pertumbuhan bakteri saja.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1) Pemberian ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menghambat pertumbuhan *Corynebacterium diphtheria* dan *Corynebacterium striatum* secara in vitro dengan metode difusi sumuran.
2) Semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji *Nigella sativa ,* maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

7.2 Saran

Beberapa saran yang dapat diberikan pada penelitian ini dan penelitian berikutnya, antara lain :

1. Perlu dilakukan uji antimikroba dengan menggunakan metode lainnya pada ekstrak biji *Nigella sativa* terhadap bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum* baik secara in vivo maupun in vitro.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak biji *Nigella sativa* sebagai antibakteri, anti fungal, anti kanker, dll.
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak biji *Nigella sativa* secara in vivo untuk melihat farmakodinamik, farmakokinetik, dan efek toksik dari bahan aktif yang terkandung dalam biji *Nigella sativa*, sebelum digunakan sebagai alternatif pengobatan.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bentuk pengaplikasian ekstrak biji *Nigella sativa* yang paling aman dan efektif untuk dikonsumsi sebagai antibiotik untuk manusia.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa* : A miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed. 2013 May; 3(5): 337–352.

Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. Anti- inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their *thymoquinone* content. AAPS Pharm Sci Tech 2012 Dec 19.

Asniyah. Efek Antibiotik Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* In Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammaditah Surakarta. Surakarta. 2009.

Berger A. Michael Hogardt M. Konrad R dan Sing A. Detection Methods for Laboratory Diagnosis of Diphtheria. Didalam : Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species Genomics, Pathogenicity and Applications. New York : Springer Dordrecht Heidelberg. 2014. Hlm 175-177.

Bilal A, Masud T, Uppal AM, Naveed AK, 2009, Effects of *Nigella sativa* oil on some blood parameters in type 2 diabetes mellitus patients. Asian J. Chem., v.21, p.5373-5381.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Ed 25. McGraw-Hill. 2010. Hlm 199-203.

Díez-Aguilar M. Ruiz-Garbajosa P.Fernández-Olmos A. Guisado P. Del Campo P. Quereda C.Cantón R. Meseguer MA. *Non-diphtheriae Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:769–772.

Diphtheria reported cases [internet]. World Health Oraganization (WHO). Diperbarui pada : 15 juli 2017. [disitasi pada 28 juli 2017]. Tersedia dari :http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencediphtheria.html

Forouzanfar F, Fazly Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (*thymoquinone*): a review on antimicrobial effects. Iran J Basic Med Sci 2014; 17:929-938.

Hendrik, Habbatus Sauda Thibbun Nabawiy dalam Menangani Berbagai Penyakit dan Memelihara Kesehatan Tubuh, Pustaka Al Umat, Surakarta, 2005, h: 70, 81- 82, 91.

Immanuel LC. Puradisastra S. Rahardja F. Efek Antibiotik Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.)* Terhadap *streptococcus pneumoniae, Corynebacterium diphtheriae, Pseudomonas aeruginosa* dan *Kleibsiella pneumoniae* Secara *in vitro.* Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranantha. Bandung. 2013.

Meyer DK. Other Coryneform Bacteria and Rhodococci. Di dalam : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principle and practice of infectious disease. Ed 7. Philadelphia : Churchill livingstone Elsevier. 2010. Hlm. 2697.

Muhammad GM. Uji Potensi Antibiotik Ektrak Bawang Putih (*Allium Sativum*) Terhadap Bakteri *C. striatum* Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran, Universitas brawijaya. Malang. 2017.

Murphy JR. *Corynebacterium Diphtheriae*. Di dalam : Baron S. Medical Microbiology. Ed 4. Texas : the university of texas medical branch at Galveston. 1996.

Notobroto, B. H. 2005. Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Perhitungan Besar Sampel Angkatan III.Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Paarakh PM. *Nigella sativa* Linn.- Comprehensive review. Indian Journal of Natural Products and Resources. 2010 desember; Vol I(4): 409-429.

Salem, N., Salem L., Saber S., Ismail G., Bluth M. H. Corynebacterium urealyticum: A Comprehensive Review of An Understated Organism. Infection and drug resistance, 2015, 8, 129.

Sjahid, L. R. 2008. Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid Dari Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.) (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta).

Sunarno , Mulyastuti Y, Puspandari N, Sariadji K. DNA Sequence Analysis of *dtxR* Gene (Partial) of *Corynebacterium diphtheriae* Causing Diphtheria in Jawa and Kalimantan Islands, Indonesia. The Indonesian Biomedical Journal. 2017 agustus; 9 (2): 91-8.

Yang, H. S., Kim Y. J., Cho S. Y., Shin E., Lee H. J. Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection By *Corynebacterium striatum* Identified By 16S rRna And rpoB Gene Sequencing. Annals Of Laboratory Medicine, 2015, 35(5), 548-550