

**UJI EKSTRAK ETANOL PADA BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa* Linn)
SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP *Candida albicans* SECARA
IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Yogesvara

165070101111026

**PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
<i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Candida albicans</i>	5
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Faktor Virulensi	8
2.1.3 Struktur Antigen	9
2.1.4 Patogenesis dan Patologi.....	10
2.1.5 Faktor Predisposisi.....	11
2.1.6 Resistensi.....	11
2.1.7 Manifestasi Klinis.....	12
2.1.8 Terapi Kandidiasis.....	14
2.2 Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn).....	14
2.2.1 Taksonomi dan Morfologi	14
2.2.2 Kandungan Kimia Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn)	16
2.2.3 Manfaat Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn)	17
2.3 Antifungi.....	18
2.3.1 Mekanisme Kerja Antifungi.....	18



2.4 Metode Ekstraksi	20
2.4.1 Jenis-jenis Ekstraksi.....	21
2.5 Uji Sensitivitas Mikroorganismen secara <i>In Vitro</i>	22
2.5.1 Metode Dilusi	22
2.5.2 Metode Difusi.....	23
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	24
3.1 Kerangka Konsep	24
3.2 Hipotesis Penelitian	26
BAB IV METODE PENELITIAN	27
4.1 Rancangan Penelitian	27
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	27
4.3 Sampel Penelitian.....	27
4.4 Pengulangan.....	28
4.5 Variabel Penelitian	28
4.5.1 Variabel Bebas.....	28
4.5.2 Variabel Terikat.....	29
4.6 Definisi Operasional.....	29
4.7 Instrumen Penelitian	31
4.7.1 Alat.....	31
4.7.2 Bahan.....	32
4.8 Prosedur Penelitian.....	32
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn)...	32
4.8.2 Identifikasi Fungi Uji <i>Candida albicans</i>	34
4.8.3 Persiapan Suspensi Fungi Uji <i>Candida albicans</i>	36
4.8.4 Uji Antifungi Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam.....	37
4.9 Analisis Data.....	40
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	41
5.1 Hasil Identifikasi Fungi <i>Candida albicans</i>	41
5.2 Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn)	43
5.3 Hasil Pengamatan Kualitatif dan Analisis terhadap KHM.....	44
5.4 Hasil Pengamatan Kuantitatif dan Analisis terhadap KBM.....	45
5.5 Analisis Data.....	48
5.5.1 Uji Normalitas dan Homogenitas.....	48
5.5.2 Uji <i>One-Way ANOVA</i>	49
5.5.3 Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	50
5.5.4 Uji Korelasi dan Regresi.....	51
BAB VI PEMBAHASAN	54
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	54
6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran.....	58
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	59

BAB VII PENUTUP	60
7.1 Kesimpulan.....	60
7.2 Saran.....	60
Daftar Pustaka.....	62
Lampiran.....	68



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Penampakan <i>Candida albicans</i> secara Mikroskopik.....	5
Gambar 2.2 Morfologi dan Struktur Dinding <i>Candida albicans</i>	6
Gambar 2.3 Kandidiasis pada Traktus Respiratori.....	7
Gambar 2.4 Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn).....	15
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	24
Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian	39
Gambar 5.1 Identifikasi Morfologi <i>Candida albicans</i>	42
Gambar 5.2 Germ-tube pada <i>Candida albicans</i>	43
Gambar 5.3 Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn).....	43
Gambar 5.4 Hasil Pengamatan Tingkat Kekeruhan pada Tabung Reaksi.....	45
Gambar 5.5 Hasil <i>Streaking</i> Campuran dari Tabung Reaksi Dilusi pada Media <i>Sabouraud Dexrose Agar</i>	46
Gambar 5.6 Grafik Jumlah Koloni <i>Candida albicans</i> terhadap Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam pada Media <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>	48
Gambar 5.7 Grafik Persamaan Regresi Linear Sederhana.....	53

DAFTAR TABEL

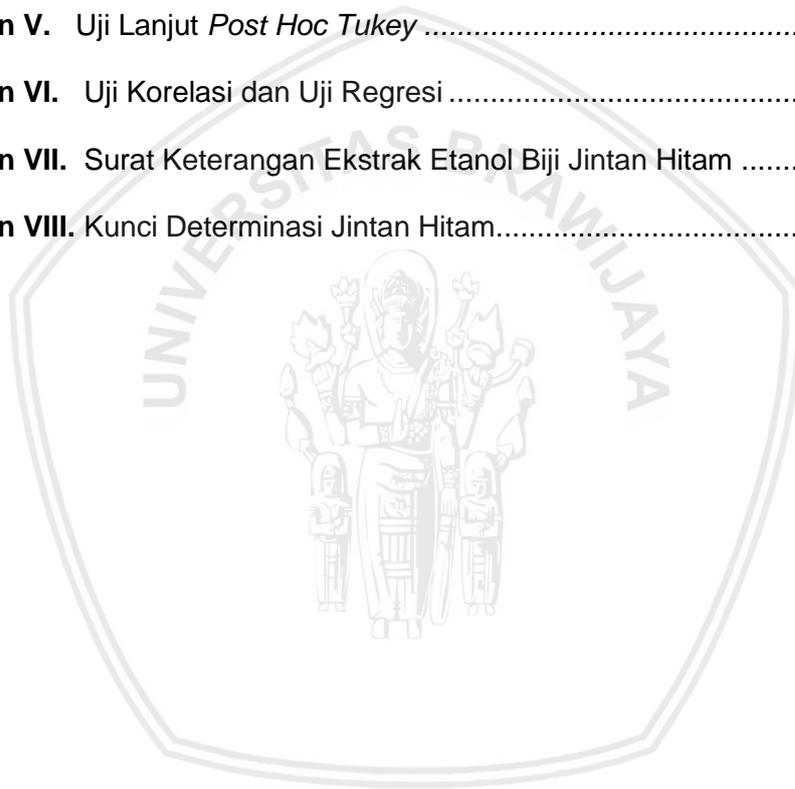
Halaman

Tabel 5.1	Hasil Penghitungan Jumlah Koloni <i>Candida albicans</i> yang Tumbuh pada Media <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>	47
------------------	--	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I. Hasil Penelitian Pendahuluan	68
Lampiran II. Alat dan Bahan Penelitian.....	69
Lampiran III. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	72
Lampiran IV. Analisis Statistik <i>One Way ANOVA</i>	73
Lampiran V. Uji Lanjut <i>Post Hoc Tukey</i>	74
Lampiran VI. Uji Korelasi dan Uji Regresi	75
Lampiran VII. Surat Keterangan Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam	78
Lampiran VIII. Kunci Determinasi Jintan Hitam.....	79



DAFTAR SINGKATAN

%	: persen
∞	: tak terhingga
>	: lebih dari
<	: kurang dari
µm	: <i>micrometer</i>
°C	: derajat <i>Celcius</i>
AIDS	: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ALS	: <i>Agglutinin Like Sequences</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CFU/ml	: <i>Colony Forming Unit/ mililiter</i>
cm	: <i>centimeter</i>
Depkes	: Departemen Kesehatan
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
<i>et al</i>	: <i>et alia</i>
FKUB	: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
g	: <i>gram</i>
H ₂ SO ₄	: <i>Sulfuric Acid</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
KB	: Kontrol Bahan
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
Kemenkes	: Kementerian Kesehatan
Kepmenkes	: Keputusan Menteri Kesehatan
KF	: Kontrol Fungi
KHM	: Kadar Hambat Minimum

KOTRANAS	: Kebijakan Obat Tradisional Nasional
MAP	: <i>mitogen-activated protein</i>
Menkes	: Menteri Kesehatan
mL	: <i>milliliter</i>
mm	: <i>milimeter</i>
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
nm	: <i>nanometer</i>
O ₂	: Oksigen
OI	: <i>Original Inoculum</i>
pH	: <i>Power of Hydrogen</i>
r	: koefisien korelasi
R	: nilai korelasi
RI	: Republik Indonesia
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
R square	: koefisien determinasi
SDA	: <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
Sig.	: nilai signifikansi
SK	: Surat Keputusan
SKN	: Sistem Kesehatan Nasional
SMA	: Sekolah Menengah Atas
sp.	: <i>species</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UPT	: Unit Pelaksana Teknis
WHO	: <i>World Health Organization</i>

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**UJI EKSTRAK ETANOL PADA BIJI JINTAN HITAM (*Nigella sativa* Linn)
SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP *Candida albicans* SECARA IN VITRO**

Oleh :

Yogesvara
NIM. 165070101111026

Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 24 September 2019
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I,



dr. Dessika Rahmawati, Sp.S, M.Biomed
NIK. 2016098212112001

Pembimbing I/Penguji II,



Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K)
NIP. 195011101980021001

Pembimbing II/Penguji III,



dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed
NIK. 2016078410212001

Mengetahui,



Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

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



ABSTRAK

Yogesvara. 2019. **Uji Ekstrak Etanol pada Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn) sebagai Antifungi terhadap *Candida albicans* secara *In Vitro*.** Tugas akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K)., (2) dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed.

Candida albicans merupakan spesies *Candida* paling patogen yang sering menjadi penyebab kandidiasis. Kandidiasis merupakan infeksi fungi yang dapat menyerang mulut, genitalia, kulit, kuku dan sistemik. Kandidiasis menjadi penyakit penyerta AIDS terbanyak pada tahun 2014 dan penyebab tersering keputihan dengan prevalensi sebesar 40%. Sementara itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa agen antifungi seperti flukonazol dan itrakonazol mulai mengalami resistensi. Berdasarkan tujuan KOTRANAS disebutkan bahwa pemanfaatan sumber daya alam dan ramuan tradisional sebagai obat bertujuan untuk meningkatkan pelayanan kesehatan. Biji jintan hitam merupakan salah satu tanaman yang memiliki efek antifungi karena mengandung senyawa seperti monoterpen, fenol, dan saponin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antifungi dari ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro* dengan desain penelitian *true experimental model post-test-only control group*. Ekstrak diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sampel fungi didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% dengan metode dilusi tabung dan pengulangan sebanyak 4 kali. Berdasarkan hasil uji *one-way ANOVA* ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap jumlah koloni *Candida albicans* ($p < 0,05$) pada taraf kepercayaan 95%. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan jumlah koloni *Candida albicans* berhubungan secara negatif terhadap konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam pada derajat korelasi sangat kuat ($r = -0,959$; $p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini yaitu ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dengan KBM ditemukan pada konsentrasi 60% dan KHM yang tidak dapat ditentukan.

Kata kunci: antifungi, *Candida albicans*, ekstrak etanol, biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn), *in vitro*

ABSTRACT

Yogesvara. 2019. **Study of Antifungal Effect of Black Cumin (*Nigella sativa* Linn) Seed Ethanolic Extract Against *Candida albicans* In Vitro.** Final Assignment, Medical Program Study, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K)., (2) dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed.

Candida albicans is the most pathogenic species of *Candida* and the most common cause of candidiasis. Candidiasis is fungal infection which could develops in mouth, vagina, skin, nail, and systemic. Candidiasis became the most common case of AIDS opportunistic infection in 2014 and the main causes of vaginal discharge in about 40%. Meanwhile, several studies have shown that antifungal such as fluconazole and itraconazole developed resistant. Based on the aim of KOTRANAS, the use of traditional medicine is used to improve health services. One of the plants is black cumin seed. It contains monoterpenes, phenols, and saponins that have antifungal effect. Objective of this research is to determine the antifungal effect of black cumin seed ethanolic extract against *Candida albicans in vitro*. Method in this research was true experimental with post-test-only control group design using tube dilution method. Extract obtained through maceration method with 96% ethanol. Samples obtained from Microbiology Laboratory of Medical Faculty Brawijaya University. Concentration of extract used were 40%, 45%, 50%, 55%, and 60% with four repetitions. *One-way ANOVA* analysis showed significant differences in changes of black cumin seed extract concentrations on colony numbers of *Candida albicans* ($p < 0,05$) with confidence level for 95%. *Pearson* correlation test showed correlation between colony numbers of *Candida albicans* toward extract concentrations in very strong degree of correlation with negative direction ($r = -0,959$; $p < 0,05$). The conclusion is black cumin (*Nigella sativa* Linn) seed ethanolic extract has antifungal effect against *Candida albicans in vitro* with MFC of 60% and MIC cannot be identified.

Keywords: antifungal, *Candida albicans*, black cumin (*Nigella sativa* Linn) seed, ethanolic extract, *in vitro*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kandidiasis merupakan infeksi yang dapat menyerang rambut, kulit, selaput lendir, dan sistemik yang disebabkan oleh genus *Candida* terutama spesies *Candida albicans* (Soetojo dan Astari, 2016). *Candida albicans* merupakan spesies dari genus *Candida* yang paling patogen (Dewi dan Aryadi, 2010). Spesies dari genus *Candida* merupakan flora normal di membran mukosa, kulit, dan saluran gastrointestinal (Brooks *et al.*, 2010). Ketika keseimbangan flora normal terganggu atau terdapat penurunan pada pertahanan imun, maka sifat *Candida* yang awalnya komensal dapat berubah menjadi patogen (Soetojo dan Astari, 2016).

Prevalensi kandidiasis invasif di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo sebesar 12,3% dengan etiologi terbanyak adalah *Candida albicans* kemudian diikuti *Candida tropicalis* dan *Candida parapsilosis* (Kalista *et al.*, 2017). Menurut Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014, penyakit penyerta AIDS terbanyak adalah kandidiasis dengan total kasus sebanyak 1.316 kasus (Kemenkes RI, 2015). Kandidiasis vulvovaginalis merupakan infeksi pada vulva atau vagina yang disebabkan oleh pertumbuhan tidak terkendali dari jamur *Candida sp.* Kandidiasis merupakan penyebab tersering kasus keputihan dengan prevalensi sebesar 40% (Jessica *et al.*, 2016). Sebanyak 75% wanita di dunia mengalami keputihan minimal sekali dalam seumur hidup dan 45% mengalami 2 kali atau lebih dan didapatkan bahwa keputihan paling sering disebabkan oleh *Candida albicans*. Kasus keputihan di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 2010,

52% wanita di Indonesia mengalami keputihan, kemudian tahun 2011 terdapat 60% wanita mengalami keputihan, pada tahun 2012 hampir 70% wanita mengalami keputihan, dan pada tahun 2013 sekitar 55% wanita Indonesia mengalami keputihan (Darma *et al.*, 2017).

Obat-obat sintetik antifungi telah berkembang luas seiring semakin tingginya kasus kandidiasis. Penggunaan obat antifungi yang terbuat dari bahan kimia sering menimbulkan banyak masalah seperti adanya efek samping yang serius, aturan pakai yang menyulitkan, resistensi, perlunya pengawasan oleh dokter dan harga yang mahal (Saifudin, 2011 dan Rintiswati *et al.*, 2004). Hingga kini *strain* *Candida* yang resisten terhadap obat antifungi memang masih jarang dilaporkan. Namun, pengembangan obat antifungi tetap perlu dilakukan mengingat bahwa kasus infeksi mikosis oportunistik selalu meningkat (Rintiswati *et al.*, 2004). Berkaitan dengan hal tersebut, maka diperlukan agen antifungi yang lebih efektif dan lebih murah.

Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan tentang Sistem Kesehatan Nasional (SKN) dikatakan bahwa peningkatan dan pengembangan obat tradisional ditujukan untuk memperoleh obat tradisional yang aman, bermutu tinggi, mempunyai khasiat yang nyata teruji secara ilmiah dan dimanfaatkan secara luas, baik untuk pengobatan sendiri oleh masyarakat ataupun untuk pelayanan kesehatan formal (Kemenkes RI, 2004). Berdasarkan Kebijakan Obat Tradisional Nasional (KOTRANAS) disebutkan bahwa penggunaan obat tradisional merupakan bagian dari budaya bangsa dan sudah dimanfaatkan oleh masyarakat sejak berabad-abad yang lalu. Salah satu tujuan KOTRANAS adalah mendorong pemanfaatan sumber daya alam dan ramuan tradisional secara berkelanjutan

untuk digunakan sebagai obat tradisional dalam upaya peningkatan pelayanan kesehatan (Kemenkes RI, 2007).

Berdasarkan hal tersebut, pemilihan biji jintan hitam sebagai tanaman obat diharapkan bisa menjadi alternatif dalam pengobatan kandidiasis. Biji jintan hitam terbukti bermanfaat sebagai antifungal, antibakteri, antivirus, antioksidan, antidiabetik, anti-inflamasi dan analgesik (Abdallah, 2017). Bagian biji dari jintan hitam memiliki kandungan zat aktif penting yang lebih banyak dibandingkan bagian daun, batang, maupun akar (Safithri, 2017). Biji jintan hitam mengandung monoterpen yang bersifat non polar dan saponin serta fenol yang cenderung bersifat polar (Septiana dan Asnani, 2012). Senyawa aktif monoterpen (*thymoquinone*) yang banyak terkandung di dalam biji jintan hitam diketahui memiliki efek antimikroba, khususnya pada *Candida albicans* (Iscan *et al.*, 2016).

Penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% karena mudah dilakukan, tidak memerlukan banyak pelarut, dan proses terbentuknya ekstrak kental lebih cepat (Anggraini dan Masfufatun, 2017). Metode maserasi merupakan ekstraksi dingin yang mampu menghindarkan kerusakan senyawa termolabil (Mukhriani, 2014). Etanol 96% merupakan pelarut yang mudah didapatkan, bersifat universal dan sering digunakan untuk proses ekstraksi. Berdasarkan penelitian tahun 2015, diketahui bahwa hasil pengujian aktivitas antimikroba menggunakan ekstrak etanol dari biji jintan hitam lebih baik dibandingkan ekstrak metanol dan ekstrak n-heksana (Gustiana *et al.*, 2015). Sementara itu, diketahui bahwa pelarut etanol mampu mengekstraksi senyawa dengan rentang polaritas yang lebih luas dibandingkan pelarut petroleum eter (Anisah *et al.*, 2014 dan Octavia, 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) memberikan efek antifungi terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek antifungi dari ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) dari ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

- a. Memberikan informasi tentang kemampuan ekstrak etanol biji jintan hitam dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*.
- b. Memberikan informasi tentang penggunaan ekstrak etanol biji jintan hitam sebagai referensi penelitian selanjutnya terkait kandidiasis dan terapi tambahan kandidiasis.

1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Memberikan inovasi terapi pengganti dari terapi yang sudah ada terkait antifungi untuk pengobatan pada pasien kandidiasis.
- b. Meningkatkan dan mengoptimalkan pemanfaatan biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) sebagai antifungi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Candida albicans*

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Taksonomi *Candida albicans* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
Phylum : Ascomycota
Subphylum : Saccharomycotina
Class : Saccharomycetes
Ordo : Saccharomycetales
Family : Metschnikowiaceae
Genus : *Candida*
Spesies : *Candida albicans*

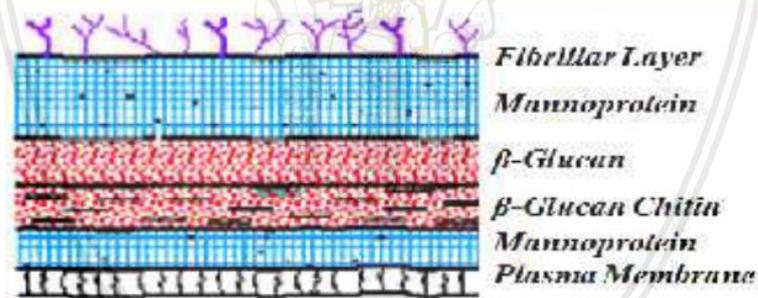
(Gow dan Yadav, 2017).



Gambar 2.1 Penampakan *Candida albicans* secara Mikroskopik

Keterangan: sel yeast (ragi) dan pseudohifa *Candida albicans* secara mikroskopis pada pewarnaan gram hapusan vagina (Greenwood *et al.*, 2012).

Candida albicans merupakan organisme dimorfik, yaitu organisme yang memiliki dua bentuk. Bentuk pertama adalah ragi dan pseudohifa yang bersifat non invasif, kedua adalah hifa sejati yang memproduksi *root like structure* dan bersifat invasif. Dinding sel *Candida albicans* bersifat dinamis dengan struktur berlapis yang terdiri dari beberapa jenis karbohidrat, yaitu *mannan*, *glucans*, dan *chitin*. *Yeast cell* (ragi) dan *germ tubes* memiliki susunan dinding sel yang mirip (Mutiawati, 2016). Komponen dinding sel berupa *beta-glucans* pada *Candida albicans* ini berperan dalam patogenesis terjadinya kandidiasis vulvovaginalis (Miro *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil pewarnaan gram, *Candida albicans* merupakan organisme gram positif, membentuk tunas (*budding*), *yeast* (ragi) berbentuk oval dengan diameter sekitar 5 μm . Pada pewarnaan gram sering terlihat pseudohifa dan terkadang terlihat miselium bersepta (Kayser *et al.*, 2005).



(1)

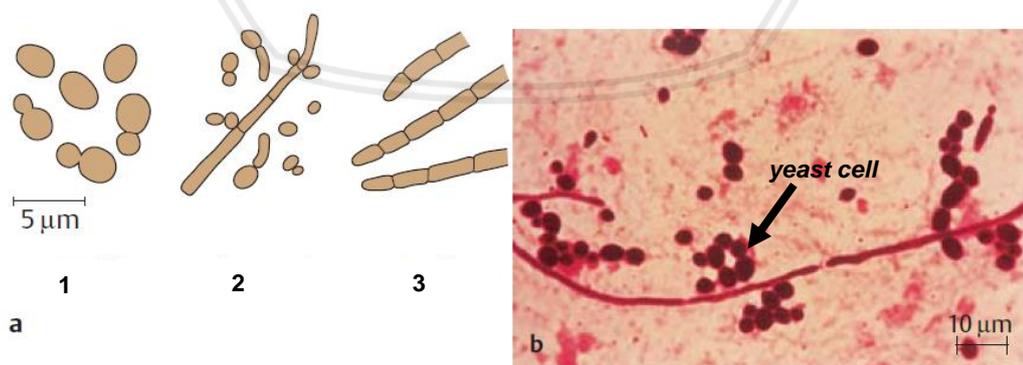


(2)

Gambar 2.2 Morfologi dan Struktur Dinding *Candida albicans*

Keterangan: (1) Struktur dinding *Candida albicans*;
(2) Pertumbuhan *Candida albicans* pada media kultur SDA (Mutiawati, 2016).

Candida albicans tumbuh pada suhu 25-37°C berbentuk sel oval yang membentuk tunas (*budding*) untuk memperbanyak diri dan spora yang disebut blastospora atau sel ragi (*yeast*). Pada gambaran mikroskopis didapatkan pseudohifa yang sebenarnya merupakan rangkaian blastospora yang bercabang-cabang. *Candida albicans* memiliki kemampuan membentuk *germ tubes* dalam serum. Reaksi positif pada pemeriksaan *germ tubes* ini sebenarnya merupakan bentukan spora besar berdinding tebal yang disebut klamidospora yang tumbuh pada suhu 35-37°C. *Candida albicans* dapat dibiakkan di media kultur *Sabouraud Dextrose Agar* dan menghasilkan koloni halus, berwarna krim putih, licin, dan berbau ragi (Mutiawati, 2016). Pada proses inkubasi dalam serum selama 90 menit pada suhu 37°C, hifa sejati atau tabung-tabung tunas dari *Candida albicans* mulai terbentuk, dan pada media yang kurang nutrisi, *Candida albicans* menghasilkan klamidospora berbentuk bulat dan besar. Beberapa penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans*, yaitu kandidiasis mukosa meliputi vulvovaginitis dan kandidiasis selaput lendir mulut, kandidiasis kutaneus, onikomikosis, kandidiasis mukokutan kronik, dan kandidiasis sistemik (Brooks *et al*, 2010).



Gambar 2.3 Kandidiasis pada Traktus Respiratori

Keterangan: (a) Bentuk morfologis: (1) *yeast cells*, (2) *pseudomycelium*, (3) *mycelium*; (b) Pewarnaan gram dari sediaan sputum: *yeast cells* gram positif dan hifa (Kayser *et al.*, 2005).

2.1.2 Faktor Virulensi

a. Transisi Morfologis antara bentuk yeast dan hifa sejati

Transisi antara bentuk *yeast* dan hifa sejati disebut dimorfisme. Kedua bentuk tersebut sangat berkaitan dengan patogenisitas dari *Candida albicans*. Bentuk hifa sejati lebih invasif dibandingkan bentuk *yeast* (Mayer *et al.*, 2013).

b. Adhesin dan Invasi

Candida albicans memiliki protein adhesin yang memediasi terjadinya penempelan (*adherence*) ke sel *Candida albicans* lain, atau ke mikroorganisme lain, atau ke permukaan abiotik dan sel host. Protein adhesin *Candida albicans* adalah protein *agglutinin-like sequences* (ALS) (Mayer *et al.*, 2013).

c. Contact Sensing dan Pembentukan Biofilm

Lingkungan memicu terbentuknya hifa dan biofilm. Apabila *Candida albicans* kontak dengan suatu permukaan, maka sel *yeast* akan berubah (*switch to*) menjadi pertumbuhan hifa sejati. Pada agar kultur atau mukosa, hifa sejati dapat melakukan invasi ke dalam substrat. Kontak dengan permukaan yang solid atau padat mampu memicu pembentukan biofilm. Biofilm dibentuk melalui proses sequensial termasuk penempelan (*adherence*) sel *yeast* ke substrat, proliferasi sel *yeast*, pembentukan hifa di bagian atas biofilm, akumulasi material matriks ekstraseluler, dan terakhir berupa dispersi sel *yeast* dari kompleks biofilm (Mayer *et al.*, 2013).

d. Phenotypic Switching

Kemampuan *Candida albicans* menginfeksi jaringan pada suatu host dapat berubah menyesuaikan perubahan lingkungan. Kadang-kadang *Candida albicans* dapat berubah secara sifat permukaan sel, morfologi, gambaran koloni,

sifat metabolisme dan sifat biokimia untuk menjadi lebih virulen. *Phenotypic switching* adalah sinyal perubahan sifat biokimia dan molekular patogen, yang ditujukan untuk pertahanan hidup fungi dalam organisme host (Lestari, 2010).

e. Sekresi Enzim Hidrolitik

Enzim hidrolitik, seperti lipase, protease, dan fosfolipase merupakan faktor virulensi yang berperan dalam nutrisi, merusak jaringan, serta penyebaran dalam host. Fase invasi membutuhkan peran enzim fosfolipase yang sangat tinggi karena fosfolipase menghidrolisis ikatan ester dalam gliserofosfolipid penyusun membran sel host. Fosfolipase sangat penting terkait virulensi fungi adalah fosfolipase B yang berperan melepas asam lemak dari fosfolipid dan lisofosfolipid, kemudian mentranferkan asam lemak bebas ke lisofosfolipid untuk membentuk fosfolipid. Enzim lipase yang dihasilkan *Candida albicans* mampu menghidrolisis ikatan ester monogliserol, digliserol, dan trigliserol (Lestari, 2010).

f. Adaptasi terhadap Fluktuasi pH Lingkungan

Candida albicans dapat beradaptasi terhadap perubahan pH *host* karena memiliki β -glukosidase Phr1 dan Phr2. Phr1 diekspresikan pada pH netral-alkali, sedangkan Phr2 diekspresikan pada pH asam. Phr1 biasanya terkait infeksi-infeksi yang bersifat sistemik, sedangkan Phr2 sering dihubungkan dengan infeksi vagina (Mayer *et al.*, 2013).

2.1.3 Struktur Antigen

Antiserum yang diabsorpsi dapat membedakan serotipe *Candida albicans*, yaitu serotipe A (mencakup *Candida tropicalis*) dan serotipe B. Antigen lain berhasil ditentukan karakternya, termasuk enolase imunodominan, protein tahan panas, dan protease yang disekresi (Brooks *et al.*, 2010).

Lapisan luar dinding sel *Candida albicans* tersusun dari mannoprotein yang terglykosilasi kuat yang berasal dari permukaan sel. Lapisan ini berperan dalam pengenalan antar sel, interaksi dengan hospes dan sifat permukaan sel (Bates dan Rosa, 2007). Lapisan dalam terdiri dari β -glukan dan kitin. β -glukan adalah komponen utama *Candida albicans* yang meliputi 50-60% berat dinding sel dan bertanggungjawab untuk konstruksi dinding sel. Ketika enzim β -glukan dihambat, maka dinding sel akan kehilangan rigiditas dan perlekatan *Candida albicans* pada sel epitel hospes menjadi berkurang secara signifikan (Kellner *et al.*, 2005). Lapisan dalam ini menentukan kekuatan mekanis dinding sel (Umeyama dan Kaneko, 2006).

2.1.4 Patogenesis dan Patologi

Candida albicans merupakan organisme endogen yang dapat ditemukan di mulut, saluran pencernaan, traktus genitalia wanita, dan kulit. Umumnya infeksi oleh jamur kandida merupakan infeksi oportunistik, dimana infeksi disebabkan oleh flora normal atau mikroorganisme penghuni sementara saat *host* sedang berada pada kondisi *immunocompromised*. Faktor virulensi *Candida albicans* juga berkontribusi menyebabkan infeksi (Lestari, 2010).

Infeksi kandida dikelompokkan menjadi tiga, yaitu kandidiasis superfisial (mukosa dan kutaneus), kandidiasis sistemik, dan kandidiasis mukokutan kronik (Brooks *et al.*, 2010).

2.1.5 Faktor Predisposisi

Infeksi *Candida albicans* dapat terjadi ketika ada beberapa faktor predisposisi meliputi penurunan imunitas yang diperantarai oleh sel, perubahan membran mukosa dan kulit, serta adanya benda asing (Lestari, 2010).

2.1.6 Resistensi

Resistensi merupakan peristiwa ketidakpekaan mikroba terhadap agen antimikroba. Resistensi antifungi dapat menjadi salah satu penyebab kegagalan pengobatan klinis infeksi jamur (Candrasari, 2014).

Mekanisme resistensi terhadap setiap jenis antifungi berbeda-beda. Mekanisme resistensi *Candida albicans* terhadap antifungi golongan *azole* meliputi (1) mekanisme secara selular yaitu perubahan menjadi spesies atau galur yang lebih resisten, resistensi sel secara temporer disebabkan oleh ekspresi gen transien, dan tipe sel yang mengalami perubahan; (2) mekanisme secara biokimiawi seperti enzim yang diproduksi berlebihan mengakibatkan obat tidak dapat bekerja secara sempurna, target obat yang berubah bentuk, dan jalur enzimatik yang mengalami modifikasi; (3) mekanisme molekular meliputi perubahan sitokrom P-450 *lanosterol 14-a-demethylase* (Yugo dan Ridhawati, 2013). Sementara itu, mekanisme resistensi *Candida albicans* terhadap antifungi golongan *polyene* seperti Amphotericin B meliputi (1) terjadinya penurunan afinitas amphotericin B terhadap membran plasma fungi akibat penurunan jumlah ergosterol; (2) aktivitas katalase yang meningkat dan penurunan suseptibilitas terhadap kerusakan oksidatif; serta (3) gangguan β -1,3-D glucans pada dinding sel fungi (Candrasari, 2014).

2.1.7 Manifestasi Klinis

Kandidiasis merupakan penyakit yang disebabkan oleh spesies genus *Candida*. Spesies-spesies tersebut adalah flora normal di tubuh manusia, seperti mukosa dan saluran gastrointestinal (Brooks *et al.*, 2010). Penyakit kandidiasis terdapat di seluruh dunia, menyerang perempuan dan laki-laki pada semua usia, terutama bayi dan lanjut usia. Kandidiasis kutis yang sering ditemukan adalah kandidiasis intertriginosa (Seru *et al.*, 2013).

Beberapa jenis kandidiasis yang lazim ditemukan adalah sebagai berikut.

a. Kandidiasis Kutaneus dan Mukosa

1) Mulut

Kandidiasis pada mukosa pada oral merupakan lesi berbentuk pseudomembran warna keputihan, dapat berupa bercak-bercak atau konfluens (menyatu) yang terdiri dari pseudohifa, sel *yeast* (ragi), dan sel epitel (Brooks *et al.*, 2010).

2) Genetalia Wanita

Kandidiasis mukosa vagina yang melibatkan sel *yeast* menyebabkan vulvovaginitis dengan gejala gatal, iritasi, dan duh vagina (Brooks *et al.*, 2010).

3) Kulit

Kandidiasis kutaneus meliputi invasi kulit yang terjadi saat kulit trauma, mengalami luka bakar, atau maserasi. Daerah yang mengalami infeksi menunjukkan gejala merah, lembab, dan terkadang disertai vesikel-vesikel (Brooks *et al.*, 2010).

4) Kuku

Tiga manifestasi klinis dari onikomikosis kandida, yaitu (1) onikomikosis subungual distal dan lateral onikolisis yang berhubungan dengan paronikia; (2) destruksi lengkap lempeng kuku, terutama pasien dengan kandidiasis mukokutan yang kronik; (3) erosi lempeng kuku bagian lateral dan distal yang tidak berujung pada distrofi total. Faktor predisposisi yang terkait dengan kandidiasis kuku adalah kelembaban tinggi, trauma kuku berulang, oklusi, imunitas yang menurun (Mamuaja *et al.*, 2017).

b. Kandidiasis Sistemik

Kandidiasis yang bersifat sistemik dan invasif merupakan kandidiasis berat yang disebabkan oleh *Candida*. Manifestasi klinis berupa endokarditis, meningitis, kandidemia, endoftalmitis, kandidiasis diseminata, dan infeksi ginjal (Kalista *et al.*, 2017). Faktor resiko kandidiasis sistemik adalah imunokompromais, kateter dalam tubuh, penyalahgunaan obat intravena, pemberian kortikosteroid jangka panjang, dan penyakit hematologis seperti leukimia dan anemia aplastik (Brooks *et al.*, 2010).

c. Kandidiasis Mukokutan Kronik

Penyakit ini tergolong langka dan biasanya menyerang bayi baru lahir atau awal masa kanak. Manifestasi klinik pada bayi yang ditunjukkan adalah ruam popok, kandidiasis kongenital, kandidiasis fungi invasif, kandidiasis orofaring. Beberapa infeksi mukokutan kronis dapat menyebabkan perubahan bentuk kulit dan mukosa (Kusumaputra dan Zulkarnain, 2014).

2.1.8 Terapi Kandidiasis

Terapi farmakologis kandidiasis mukosa oral dan mukokutan biasanya menggunakan nistatin topikal atau flukonazol oral. Kandidiasis sistemik menggunakan terapi farmakologis berupa amfoterisin B dan kadang ditambah dengan flukonazol, caspofungin oral, atau flusitosin. Terapi kandidiasis mukokutan kronis berupa ketokonazol oral dan jenis azol lainnya (Brooks *et al.*, 2010).

Berdasarkan Pedoman Nasional Penanganan Infeksi Menular Seksual Tahun 2015, infeksi *Candida* pada vagina diterapi menggunakan klotrimazol, flukonazol, itrakonazol, atau nistatin (Kemenkes RI, 2015).

2.2 Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

2.2.1 Taksonomi dan Morfologi

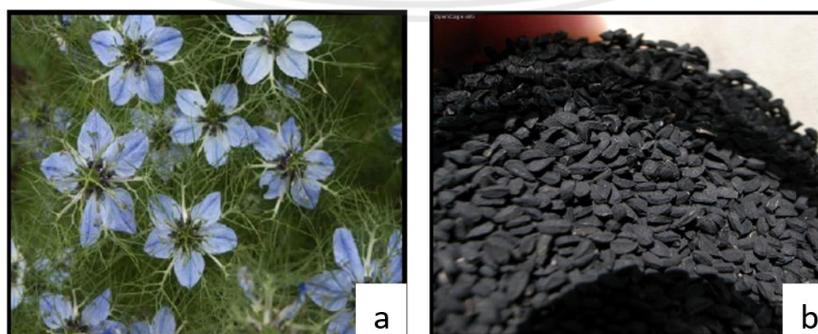
Taksonomi jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Ranunculaceae
Genus	: <i>Nigella</i>
Spesies	: <i>Nigella sativa</i> Linn

(Sultana *et al.*, 2015).

Jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) berasal dari Famili Ranunculaceae yang tumbuh endemik di Timur Tengah dan Mediterania Selatan. Jintan hitam berfungsi sebagai antiparasit, antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, dan antikanker (Rumampuk *et al.*, 2016).

Tanaman jintan hitam tingginya sekitar 20 – 90 cm, daun berwarna hijau dan lonjong, pangkal dan ujungnya runcing, beringgit pada bagian tepi, serta tulang daun menyirip dengan panjang 1,5 – 2 cm. Bunga dari tanaman ini mejemuk berbentuk seperti karang, benang sari banyak dan kepala sari berwarna putih, kuning, merah muda, biru muda, atau ungu muda. Mahkota bunga bentuk corong berwarna biru hingga putih dengan kelopak bunga sebanyak 5 – 10 dalam satu batang pohon jintan hitam. Batang dari tanaman ini tegak, berusuk, berbulu kasar, jarang-jarang atau rapat dan seperti tampak bulu-bulu kelenjar. Buah bertekstur keras seperti buni, besar, berisi unit folikel sebanyak 3 – 7 yang masing-masing berisi biji jintan hitam. Bijinya berwarna hitam dan bentuknya menyerupai kerucut dengan panjang 3 mm serta berkelenjar. Biji jintan hitam kecil, dikotil, berwarna hitam pada bagian luar dan putih pada bagian dalam, berbau aromatik dan memiliki rasa pahit. (Sultana *et al.*, 2015).



Gambar 2.4 Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Keterangan: (a) bunga jintan hitam, (b) biji jintan hitam (Sultana *et al.*, 2015)

2.2.2 Kandungan Kimia Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Bagian biji dari jintan hitam yang berukuran sangat kecil memiliki banyak kandungan senyawa bioaktif. Pada biji jintan hitam ditemukan derivat-derivat dari alkaloid, steroid, saponin, *terpenes*, *monoterpenes*, dan senyawa fenol. Diantara senyawa murni yang diisolasi dari biji jintan hitam didapatkan *nigellicine*, *nigellimine*, *nigellimine N-oxide*, *carvone*, *thymol*, dan *thymoquinone*. Senyawa-senyawa kimia yang terkandung di dalam biji jintan hitam memiliki manfaat di bidang medis termasuk sebagai obat antimikroba (Abdallah, 2017).

Monoterpene dalam biji jintan hitam terdiri atas 27,8-57% *thymoquinone* dan sisanya *monoterpene* lain. Senyawa bioaktif utama biji jintan hitam adalah *thymoquinone*. *Thymoquinone* terkumpul di bagian biji, sehingga diperlukan perusakan kulit dari biji jintan hitam untuk mendapatkan *thymoquinone*, *nigellidine* dan *nigellicine* terkumpul di seluruh kulit biji dan sebagian dari bagian dalam, sementara saponin ditemukan di kulit biji dan bagian dalam biji (Safithri, 2017).

Manfaat biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dalam bidang medis adalah sebagai antifungal, antibakteri, antivirus, antioksidan, antidiabetik, anti-inflamasi dan analgesik (Abdallah, 2017).

a. Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosilat yang dibagi menjadi 3 grup besar, yaitu steroid, triterpenoid, dan steroid glikoalkoloid. Mekanisme aksi antifungi yang dibentuk oleh saponin belum diketahui secara jelas, tetapi dipercaya bahwa saponin membentuk suatu kompleks dengan sterol di membran sel yang menyebabkan pembentukan lubang (*pore*) dan penghilangan integritas membran (Turk, 2006). Saponin diketahui mampu menghambat sintesis *glucan* dan *chitin* (Mazu *et al.*, 2016). Secara *in vitro*, aktivitas antifungi dari saponin mampu

menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, dan *Cryptococcus neoformans* (Zhang *et al.*, 2006).

b. Monoterpen

Monoterpen merupakan bagian dari isoprenoid produk alami. Senyawa ini berperan dalam memberikan bau khas suatu tanaman, pertahanan antifungal, dan manfaat pengobatan lainnya (Bouwmeester *et al.*, 1998). Mekanisme antifungi yang dilakukan monoterpen pada sel mikroorganisme (jamur) adalah merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma dan organela, serta menghilangkan integritas membran (Miron *et al.*, 2014).

c. Fenol

Senyawa dengan satu atau lebih gugus hidroksil menempel pada cincin aromatik disebut senyawa fenol. Mekanisme fenol sebagai antijamur adalah (1) mengubah permeabilitas sel dengan merusak membran sel sehingga pertumbuhan sel terhambat atau sel jamur mati, (2) melisiskan dinding sel jamur melalui proses denaturasi protein, (3) mengganggu jalur metabolik dari ergosterol, protein, kitin, glukosamin, dan glukukan dengan cara berdifusi pada membran sel jamur (Pulungan, 2017).

2.2.3 Manfaat Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dimanfaatkan dalam dunia kesehatan untuk mengatasi penyakit-penyakit terkait sistem respirasi, sistem kardiovaskular, sistem imun, digestif, hepar, dan ginjal (Islam *et al.*, 2017).

Biji jintan hitam memiliki kandungan *essential oil* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen antifungi. Biji jintan hitam juga berperan sebagai antibakteri, antiviral,

antioksidan, anti-arthritis, anti-diabetik, antikanker, anti-inflamasi, analgesik, anti-ansietas, terapi penyakit terkait sistem respirasi, *hepato-protective*, *nephroprotective*, *gastroprotective*, imunomodulator (Abdallah, 2017).

2.3 Antifungi

Infeksi jamur superfisial di kulit ataupun mukosa sering diobati menggunakan antifungi topikal, yaitu *polyenes* seperti nistatin, golongan *azole*, clotrimazole, miconazole, dan sebagainya. Terapi pilihan untuk kandidiasis invasif adalah antifungi golongan *echinocandin* intravena, amphotericin B intravena, dan flukonazol oral maupun intravena (Greenwood *et al.*, 2012).

Terapi antifungi telah mengalami banyak transformasi dalam beberapa tahun terakhir. Terdapat dua jenis antifungi, yaitu topikal dan sistemik. Setiap agen antifungi memiliki spektrum yang berbeda-beda (Murray *et al.*, 2013). Spektrum antifungi merupakan rentang aktivitas dari antifungi melawan fungi atau jamur tertentu. Antifungi spektrum luas mampu menghambat pertumbuhan jamur secara luas, termasuk bentuk jamur *mold* maupun *yeast-like fungi*, sedangkan antifungi spektrum sempit hanya mampu aktif melawan beberapa fungi atau jamur. Agen antifungi memiliki mekanisme kerja yang berbeda dan tempat yang berbeda (Murray *et al.*, 2013).

2.3.1 Mekanisme Kerja Antifungi

Mekanisme kerja antifungi berdasarkan tempat atau situs kerjanya antara lain sebagai berikut:

a. Menghambat sintesis protein

Contoh obat antifungi yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein adalah sordarin dan azasordarin. Kedua obat tersebut merupakan golongan antifungi spektrum luas (Murray et al., 2013).

b. Menghambat sintesis asam nukleat

Proses penyerapan antifungi oleh sel jamur dibantu oleh enzim sitosin permease. Antifungi dengan mekanisme ini awalnya diubah menjadi 5-FU kemudian menjadi 5-fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) dan fluorouridin trifosfat (FUTP) yang masing-masing bertugas menghambat pembentukan atau sintesis DNA dan RNA di sel. Antifungi jenis ini bersinergi dengan amfoterisin B, meningkatkan proses penetrasi flusitosin melalui membran sel jamur yang telah dirusak oleh amfoterisin B (Katzung et al., 2013). Contoh antifungi dengan mekanisme menghambat pembentukan atau sintesis asam nukleat adalah Flusitosin (Murray et al., 2013).

c. Merusak mikrotubul dan menghambat mitosis

Contoh obat antifungi dengan mekanisme merusak mikrotubul dan menghambat proses mitosis adalah griseofulvin (Murray et al., 2013). Griseofulvin berasal dari suatu spesies penisilium. Obat fungistatik ini diberikan sebagai terapi sistemik dermatofitosis. Penyerapan griseofulvin semakin meningkat apabila dikonsumsi bersamaan dengan makanan yang berlemak (Katzung et al., 2013).

d. Merusak membran sel secara langsung

Obat antifungi yang berperan langsung merusak membran sel jamur adalah golongan *polyenes* (Murray et al., 2013). Contoh obat golongan *polyenes* adalah amfoterisin B dan nistatin. Amfoterisin B bekerja dengan cara mengikat

ergosterol dan permeabilitas sel diubah dengan membentuk pori-pori terkait amfoterisin B di membran sel. Pori-pori tersebut mengakibatkan kebocoran ion dan makromolekul intrasel, sehingga menyebabkan kematian sel (Katzung *et al.*, 2013).

e. Menghambat sintesis ergosterol

Contoh antifungi yang bekerja dengan menghambat pembentukan ergosterol adalah obat-obat golongan azol, seperti ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, dan lain-lain. Aktivitas azol terjadi dengan adanya reduksi sintesis ergosterol oleh karena inhibisi enzim-enzim sitokrom P450 jamur. Pemakaian obat golongan azol sebagai profilaksis dan terapi dimungkinkan menjadi penyebab dari terjadinya resistensi pada beberapa jenis jamur (Katzung *et al.*, 2013).

f. Menghambat sintesis glukukan dan sintesis kitin

Golongan obat antifungi terbaru yang sedang dikembangkan adalah ekinokandin. Ekinokandin merupakan peptida siklik besar dikaitkan ke asam lemak rantai panjang. Mekanisme kerja ekinokandin di dinding sel fungi adalah dengan menghambat pembentukan $\beta(1-3)$ glukukan, sehingga mengakibatkan kerusakan dinding sel dan kematian fungi. Sementara itu, contoh obat antifungi yang bekerja menghambat sintesis kitin adalah Nikkomycin Z (Katzung *et al.*, 2013).

2.4 Metode Ekstraksi

Proses pemisahan bahan dari campurannya dengan pelarut yang sesuai disebut ekstraksi. Proses ini dihentikan saat kesetimbangan konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan senyawa dalam sel tanaman telah dicapai. Metode ekstraksi dipilih bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang ingin diisolasi, sehingga perlu dilakukan penentuan target ekstraksi terlebih dahulu (Mukhriani, 2014).

2.4.1 Jenis-Jenis Ekstraksi

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan pengadukan beberapa kali pada suhu ruang. Metode ini memiliki prinsip mencapai konsentrasi pada keseimbangan (Depkes RI, 2000).

Metode ini paling banyak digunakan. Kekurangan maserasi adalah waktu pengerjaan yang lama, menggunakan pelarut yang cukup banyak, memungkinkan hilangnya beberapa senyawa, memungkinkan adanya kesulitan mengekstraksi beberapa jenis senyawa pada suhu ruang. Keuntungan maserasi adalah mampu meminimalkan atau menghindarkan kerusakan senyawa yang termolabil (Mukhriani, 2014).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi yang selalu menggunakan pelarut baru hingga sempurna (*exhaustive extraction*) dan dilakukan pada suhu ruang. Tahap-tahap dalam metode ini adalah tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perlokasi sebenarnya (penampungan ekstrak), hingga memperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

Kelebihan metode perkolasi adalah sampel selalu dialiri pelarut yang baru. Kekurangan dari perkolasi adalah kesulitan pelarut menjangkau seluruh area apabila sampel dalam perkolator tidak homogen, waktu pengerjaan tergolong lama, dan membutuhkan pelarut yang cukup banyak (Mukhriani, 2014).

c. Soxhlet

Proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru, dilakukan dengan alat khusus, sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

Keuntungan menggunakan metode ini adalah proses ekstraksi kontinu, ekstraksi sampel oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga jumlah pelarut yang dibutuhkan tidak terlalu banyak dan proses pengerjaan tidak terlalu lama. Kekurangan metode Soxhlet adalah degradasi pada senyawa termolabil dikarenakan perolehan ekstrak terus-menerus pada titik didih (Mukhriani, 2014).

d. Reflux

Metode ekstraksi dengan pelarut pada titik didih selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Kerugian dari metode ini adalah memungkinkan degradasi senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014).

2.5 Uji Sensitivitas Mikroorganisme secara *In Vitro*

2.5.1 Metode Dilusi

Dilusi adalah metode untuk mengukur aktivitas dari antimikroba tertentu. Antimikroba dicampurkan ke dalam medium bakteriologis cair atau solid, kemudian medium diinokulasi bakteri atau kuman penguji dan diinkubasi. Tujuan metode dilusi adalah untuk mengetahui jumlah substansi antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh bakteri atau kuman penguji. Metode dilusi dibedakan menjadi 2 macam, yaitu metode dilusi tabung dan dilusi agar. Dilusi agar membutuhkan waktu lebih lama, selain itu penggunaannya tergantung pada kondisi tertentu. Uji dilusi cair di dalam tabung uji tidak praktis, namun sekarang

metode tersebut disederhanakan menjadi mikrodilusi cair atau *microbroth*. Keuntungan *microbroth* adalah memungkinkan mendapatkan informasi mengenai hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang dibutuhkan untuk menghambat mikroorganisme yang diuji (Brooks *et al.*, 2010).

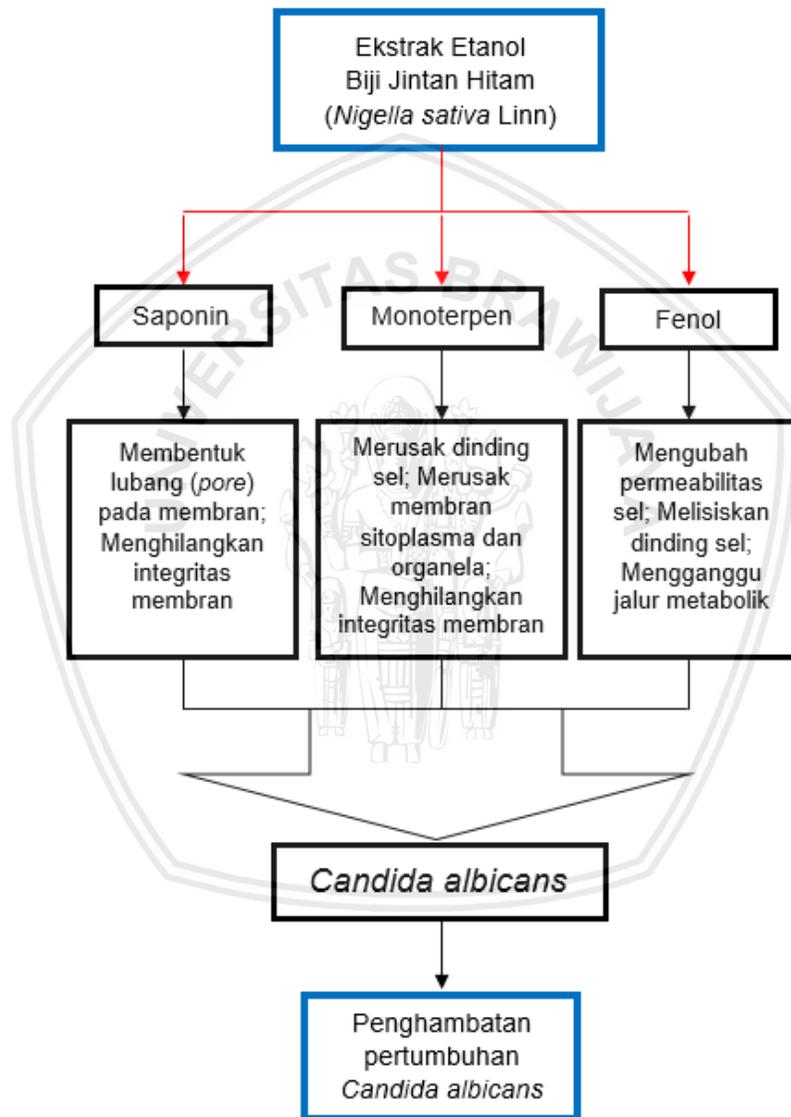
2.5.2 Metode Difusi

Metode difusi lempeng atau cakram menggunakan kertas saring yang mengandung obat antimikroba dalam jumlah tertentu yang ditempatkan di permukaan medium solid yang telah diinokulasi mikroorganisme penguji. Setelah melalui proses inkubasi, diameter zona inhibisi jernih yang mengelilingi lempeng diukur sebagai nilai kekuatan inhibitorik antimikroba terhadap mikroorganisme tersebut. Interpretasi hasil uji difusi didasarkan pada perbandingan antara metode difusi dan metode dilusi (Brooks *et al.*, 2010).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan: Ekstrak etanol biji jintan hitam mengandung senyawa monoterpen, saponin dan fenol. Ketiga senyawa tersebut berperan sebagai antifungi dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda. Variabel yang diteliti adalah ekstrak etanol biji jintan hitam dan pertumbuhan *Candida albicans*.

Keterangan:



: Variabel yang diteliti



: Kandungan yang dimiliki



: Mekanisme kerja antifungi



: Pemberian bahan antifungi



: Efek ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn)

Biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) mengandung banyak senyawa kimia yang berperan sebagai antimikroba. Beberapa kandungan biji jintan hitam adalah saponin, monoterpen terutama *thymoquinone*, dan fenol. Ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dihasilkan melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Saponin dalam biji jintan hitam mampu membuat lubang pada membran sel dan menghilangkan integritas membran tersebut. Monoterpen berperan dalam merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma dan organela, serta menghilangkan integritas membran. Sebagai antifungi, fenol memiliki fungsi mengubah permeabilitas membran sel, melisiskan dinding sel jamur, dan mengganggu jalur metabolik dari ergosterol, protein, kitin, glukosamin, dan glukon dengan cara berdifusi pada membran sel jamur.

Ekstrak etanol biji jintan hitam akan dicobakan ke biakan jamur *Candida albicans* sehingga berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak etanol biji jintan hitam efektif digunakan sebagai antifungi yang membunuh atau menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain pada penelitian ini adalah *true experimental* dengan model rancangan eksperimental *post-test only control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan mengetahui efek antifungi dari ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*. Uji antimikroba yang digunakan adalah metode dilusi tabung. Terdapat 2 tahap metode dilusi yang dilakukan, yaitu tahap pertama berupa pengujian pada media cair (*Sabouraud Dextrose Broth*) yang bertujuan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan dilanjutkan tahap kedua berupa pengujian di *Sabouraud Dextrose Agar* untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2019.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fungi *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Pengulangan

Pada penelitian eksperimental ini digunakan rumus Federer untuk menentukan banyaknya pengulangan penelitian (Syahdrajat, 2018):

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

Keterangan:

n = jumlah ulangan minimal dari setiap perlakuan

t = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini digunakan 1 kontrol bahan, 1 kontrol fungsi, dan 5 konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam, sehingga didapatkan nilai t (jumlah perlakuan) sebagai berikut:

$$t = 1+1+5 = 7$$

maka didapatkan jumlah pengulangan sesuai rumus Federer sebagai berikut:

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

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \approx 4$$

Jadi, jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak 4 kali.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dengan berbagai konsentrasi yang diperoleh dari eksplorasi penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Candida albicans* yang ditunjukkan oleh tingkat kekeruhan pada tabung untuk menentukan KHM dan pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada medium *Saburoud Dextrose Agar* untuk menentukan KBM.

4.6 Definisi Operasional

- a. Biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari UPT Materia Medica Batu.
- b. Ekstrak biji jintan hitam merupakan konsentrasi biji jintan hitam yang diekstraksi menggunakan proses ekstraksi dingin, yaitu maserasi dengan pelarut etanol 96%.
- c. Fungi *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang diambil dari isolat pasien Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.
- d. Uji sensitivitas antimikroba merupakan uji untuk mengukur dan menentukan keefektifan agen antimikroba, dalam hal ini berupa ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* yang ditentukan berdasarkan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).
- e. Antifungi adalah suatu agen yang bersifat fungisidal dan/atau fungistatik. Fungisidal ditentukan berdasarkan kadar bunuh minimum (KBM) dan fungistatik ditentukan berdasarkan kadar hambat minimum (KHM). Suatu

agen dapat dikatakan sebagai antifungi apabila hanya bersifat fungisidal atau hanya bersifat fungistatik atau bersifat fungisidal dan fungistatik.

- f. KHM (Kadar Hambat Minimum) merupakan konsentrasi terendah atau minimum larutan ekstrak etanol biji jintan hitam yang mampu menghambat pertumbuhan koloni *Candida albicans*. Hal ini diidentifikasi dengan melihat tingkat kekeruhan tabung dilusi setelah diinkubasi.
- g. KBM (Kadar Bunuh Minimum) merupakan konsentrasi terendah atau minimum larutan ekstrak etanol biji jintan hitam yang mampu membunuh fungi *Candida albicans*. Hal ini ditandai dengan pertumbuhan koloni fungi sejumlah $< 0,1\%$ dari *original inoculum* pada medium *Sabouroud Dextrose Agar* setelah dilakukan penggoresan atau *streaking*.
- h. *Original inoculum* merupakan inokulasi fungi dengan konsentrasi 10^4 CFU/mL yang diinokulasikan pada media *Sabouraud Dextrose Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Original inoculum* digunakan untuk mencari kategori KBM.
- i. Kontrol Fungi (kontrol positif) adalah tabung dengan fungi *Candida albicans* tanpa larutan ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn). Pada kontrol fungi ini tabung dengan konsentrasi 0% digunakan untuk mengetahui apakah fungi yang digunakan terkontaminasi oleh mikroba lain. Pada penelitian ini, kontrol fungi diisi dengan *Candida albicans* dan aquades untuk melihat ada atau tidaknya kontaminasi.
- j. Kontrol Bahan (kontrol negatif) adalah tabung yang berisi bahan berupa larutan ekstrak etanol biji jintan hitam.
- k. % adalah persentase konsentrasi akhir larutan ekstrak etanol biji jintan hitam sebelum ditambah fungi.

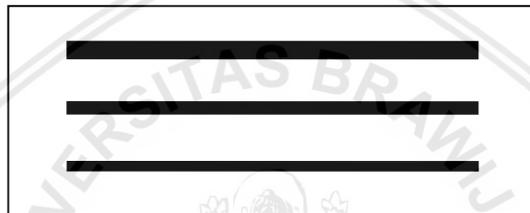
- I. Pengamatan Kualitatif merupakan pengamatan untuk menentukan skor pertumbuhan *Candida albicans* didasarkan pada bayangan 3 garis hitam yang terlihat di balik tabung. Kriteria *scoring* sebagai berikut:

0 : jernih (ketiga garis tampak jelas)

1 : agak keruh (garis pertama dan kedua tampak, garis ketiga tidak tampak)

2 : keruh (garis pertama tampak, garis kedua dan ketiga tidak tampak)

3 : sangat keruh (ketiga garis tidak tampak)



- m. Pengamatan Kuantitatif merupakan pengamatan yang bertujuan menentukan pertumbuhan *Candida albicans* dengan menghitung koloni fungi dengan *colony counter*.

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi: timbangan analitik, gelas beaker, oven, gelas erlenmeyer 1 Liter, labu evaporasi 1 Liter, *rotatory evaporator*, pemanas *water bath*, labu erlenmeyer hasil ekstraksi, *object glass* dan *cover glass*, mikroskop, spidol permanen, penjepit, bunsen dan spiritus, korek api, *staining jar*, botol steril, tabung reaksi (*tube*) steril, ose, inkubator, rak tabung reaksi, kertas label, mikropipet, pipet, lidi kapas, spektrofotometer, *vortex*, dan *colony counter*.

4.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi: biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn), larutan etanol 96%, serum mamalia, isolat *Candida albicans*, minyak imersi, *tissue* bersih, *crystal violet*, perbenihan cair fungi dengan kepadatan 10^3 CFU/mL, lugol, alkohol 96%, safranin, *saburoud broth*, larutan NaCl, kertas penghisap, aquades, dan medium *Saburoud Dextrose Agar*.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol biji jintan hitam, identifikasi fungi uji *Candida albicans*, persiapan suspensi fungi uji *Candida albicans*, dan uji antifungi ekstrak etanol biji jintan hitam.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Sediaan cair dibuat dengan cara mengekstraksi bahan. Bahan direndam dengan pelarut etanol 96% dalam suatu wadah selama periode waktu tertentu sambil sesekali diaduk, lalu disaring dan diambil larutannya. Berikut ini tahapan metode ekstraksi maserasi yang dilakukan di Politeknik Negeri Malang Jurusan Teknik Kimia.

a. Tahap Pengeringan

Kualitas dan daya simpan bahan yang diekstrak dipengaruhi oleh tingkat kekeringan bahan. Kadar air dalam suatu bahan ditentukan melalui metode pengeringan dengan oven biasa. Pada penelitian ini, bahan yang digunakan adalah biji jintan hitam. Langkah-langkah pengeringan adalah sebagai berikut:

1. Biji jintan hitam dicuci untuk menghilangkan kotoran.
2. Bahan berupa biji jintan hitam ditimbang sebelum dikeringkan.

3. Bahan dikeringkan dan diperluas permukaannya sesuai dengan luas tatakan dan besar oven pengering.
4. Bahan dipanaskan selama beberapa jam dengan suhu 50 – 70 °C (tergantung pada jenis bahan). Tujuan dilakukan hal ini adalah agar penyebaran udara panas terdistribusi merata.
5. Bahan yang sudah kering (kadar air sekitar < 3%) dikeluarkan dari oven dan dibiarkan dingin dengan sendirinya selama 30 menit.
6. Setelah dingin, bahan dihancurkan dengan cara diblender atau ditumbuk sampai halus.
7. Bahan disaring untuk memisahkan partikel yang relatif besar dan komponen tepung dari bahan.
8. Komponen tepung diambil kemudian diekstrak dengan metode maserasi.

b. Tahap Ekstraksi

1. Bahan berupa bubuk biji jantan hitam ditimbang dengan jumlah tertentu.
2. Bahan dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian pelarut dituangkan dengan perbandingan bahan dan pelarut adalah 1:4. Apabila berat bahan 1 kg maka dibutuhkan pelarut sebanyak 4 liter.
3. Bahan direndam dan didiamkan pada suhu ruang selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk.
4. Setelah minimal 2 x 24 jam, bahan disaring dengan memakai kertas saring *whatman* nomor 40 dan hasil yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) selanjutnya dievaporasi agar sisa pelarut dapat dihilangkan.
5. Sisa pelarut yang masih ada dipanaskan dengan oven pada suhu 40 – 50 °C sampai bahan tersebut benar-benar tidak mengandung pelarut.

4.8.2 Identifikasi Fungi Uji *Candida albicans*

Identifikasi fungi *Candida albicans* menggunakan uji *germ – tube* dan pewarnaan gram. Berikut ini adalah tahapan uji *germ-tube* dan pewarnaan gram.

a. Uji Germ – Tube

1. Serum mamalia diletakkan ke dalam tabung (*tube*).
2. Isolat *Candida albicans* diambil menggunakan ose yang disterilisasi dan isolat ditambahkan ke tabung yang sudah berisi serum mamalia.
3. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama \pm 4 jam.
4. Kultur diambil di dalam serum menggunakan ose dan diletakkan pada *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass*.
5. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran total 400X.

(Noorhamdani *et al.*, 2017)

b. Pewarnaan Gram

1. Gambar lingkaran dibuat di salah satu sisi *object glass* menggunakan spidol permanen untuk membatasi area lapang pandang saat dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.
2. Posisi *object glass* dibalik, sehingga sisi yang telah digambar lingkaran berada di bagian bawah.
3. Bagian atas *object glass* dibersihkan dengan tissue bersih kemudian *object glass* dilewatkan di atas api beberapa kali untuk melarutkan dan menghilangkan lemak, kemudian *object glass* ditaruh di tempat yang datar.
4. Ose disterilkan dengan cara dipanaskan. Tutup aquades *tube* dibuka dan dipanasi di bagian bibir *tube* tersebut. Satu tetes aquades diambil menggunakan ose dan diletakkan di area lingkaran di atas *object glass*. Selanjutnya ose dipanaskan agar kembali steril dan *tube* aquades ditutup.

5. *Tube* yang mengandung spesimen fungi *Candida albicans* dibuka, kemudian bibir *tube* dipanaskan. Satu koloni diambil menggunakan ose yang telah steril, kemudian diletakkan ke area lingkaran dan dibuat suspensi dengan aquades yang sudah ada di area lingkaran tersebut. Selanjutnya *tube* ditutup dan ose disterilkan.
6. Suspensi di atas *object glass* dibiarkan mengering, lalu difiksasi dengan cara *object glass* dilewatkan di atas api bunsen beberapa kali. Dipastikan bahwa bagian yang terkena api bukan merupakan suspensi.
7. Suspensi dibanjiri dengan *crystal violet* selama 1 menit.
8. *Crystal violet* dibuang dan bilas dengan air, kemudian dikeringkan dengan kertas penghisap.
9. Suspensi dibanjiri dengan lugol selama 1 menit.
10. Lugol dibuang, bilas dengan air lalu dikeringkan dengan kertas penghisap.
11. Suspensi dibanjiri dengan alkohol 96% selama 5-10 detik.
12. Alkohol 96% dibuang, bilas dengan air lalu dikeringkan dengan kertas penghisap.
13. Suspensi dibanjiri dengan safranin selama ½ menit.
14. Safranin dibuang dan bilas dengan air lalu dikeringkan dengan kertas penghisap.
15. Diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran total 1000X dengan ditambahkan minyak imersi.
16. Hasil positif: *Candida albicans* tercat ungu atau violet (Gram Positif), bentuk *budding*.

(Noorhamdani *et al.*, 2017)

4.8.3 Persiapan Suspensi Fungi Uji *Candida albicans*

1. Penggoresan *Candida albicans* pada medium SDA dan inkubasi pada suhu 37°C untuk mendapatkan kultur *Candida albicans* murni (WHO, 2009).
2. Diambil 10 koloni yang memiliki diameter sekitar 1 mm dari *plate* SDA yang telah diinkubasi selama 24 jam menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam NaCl 0,9% (*normal saline* steril) 10 mL sehingga terbentuk suspensi (WHO, 2009).
3. Suspensi tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 15 detik, kemudian turbiditas atau kekeruhan sel dihitung menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 530 nm yaitu setara dengan nilai absorbansi 0,1 dan setara dengan jumlah koloni 1×10^6 sampai dengan 5×10^6 CFU/ml. Prosedur ini akan menghasilkan pertumbuhan semi-konfluen dengan sebagian besar spesies *Candida* (WHO, 2009 dan Rezeki *et al.*, 2017).
4. Pengenceran *Candida albicans* dengan metode dilusi dapat dihitung menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut.

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

N1 = Nilai absorbansi (OD) suspensi fungi hasil spektrofotometri

N2 = Nilai absorbansi (OD) 0,1 dimana setara dengan kepadatan 10^6 CFU/mL.

V1 = Volume fungi dengan pengenceran

V2 = Volume suspensi fungi (10 ml)

(Puspitasari *et al.*, 2012 dan Tudela *et al.*, 2001).

5. Setelah diketahui volume fungi uji yang akan ditambah pengencer, selanjutnya melakukan pengenceran. Cara melakukan pengenceran yaitu

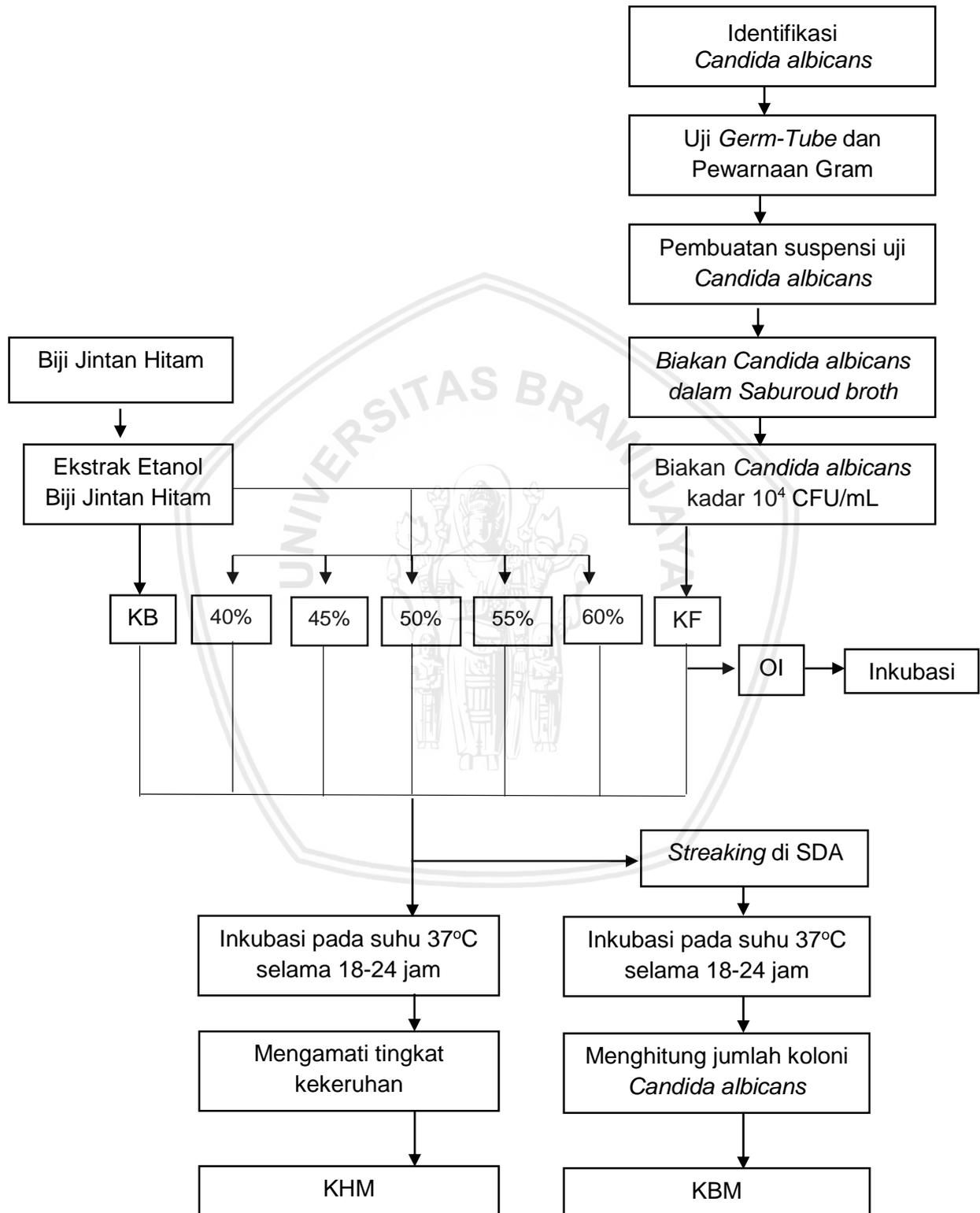
diambil 1 ml suspensi *Candida albicans* yang telah diukur dengan spektrofotometri sebelumnya (langkah 3) dengan pipet lalu dicampurkan ke dalam 9 ml NaCl 0,9% dan diberi label Tabung A. Selanjutnya, diambil 1 ml suspensi dari Tabung A dan dicampurkan dengan 9 ml NaCl 0,9% dan diberi label Tabung B. Tabung B setara dengan 1×10^4 sampai dengan 5×10^4 CFU/ml (WHO, 2009 dan Rezeki *et al.*, 2017).

4.8.4 Uji Antifungi Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam

1. Tujuh tabung reaksi steril disiapkan dan diberi label KF, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, dan KB. Kontrol bahan (KB) merupakan ekstrak etanol biji jintan hitam dan kontrol fungsi (KF) merupakan biakan *Candida albicans* dengan kadar 10^4 CFU/mL.
2. Dimasukkan 0,60 mL aquades steril ke dalam tabung reaksi bertanda 40%, kemudian ditambahkan 0,40 mL ekstrak etanol biji jintan hitam.
3. Dimasukkan 0,55 mL aquades steril ke dalam tabung reaksi bertanda 45%, kemudian ditambahkan 0,45 mL ekstrak etanol biji jintan hitam.
4. Dimasukkan 0,50 mL aquades steril ke dalam tabung reaksi bertanda 50%, kemudian ditambahkan 0,50 mL ekstrak etanol biji jintan hitam.
5. Dimasukkan 0,45 mL aquades steril ke dalam tabung reaksi bertanda 55%, kemudian ditambahkan 0,55 mL ekstrak etanol biji jintan hitam.
6. Dimasukkan 0,40 mL aquades steril ke dalam tabung reaksi bertanda 60%, kemudian ditambahkan 0,60 mL ekstrak etanol biji jintan hitam.
7. Dimasukkan 1 mL aquades steril ke tabung reaksi bertanda KF (kontrol fungsi).
8. Ditambahkan 1 mL biakan cair *Candida albicans* ke dalam tabung reaksi bertanda 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, dan KF.

9. Dimasukkan 2 mL ekstrak etanol biji jintan hitam ke dalam tabung reaksi bertanda KB (kontrol bahan).
10. Satu ose bahan diambil dari tabung reaksi bertanda KF kemudian diinokulasikan pada *Sabouroud Dextrose Agar* sebagai *original inoculum* (OI).
11. Semua tabung reaksi dan *plate original inoculum* diinkubasi pada suhu 37°C sampai 37,5°C selama 18-24 jam.
12. Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat tingkat kekeruhan di semua tabung reaksi. Cara mengidentifikasi tingkat kekeruhan adalah dengan meletakkan selembar kertas putih bergambar 3 garis hitam dengan ketebalan yang berbeda, kemudian, pengamat memperhatikan garis hitam dari bagian depan tabung reaksi. Kadar atau konsentrasi terendah yang menunjukkan ketiga garis dengan jelas merupakan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum).
13. Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung menggunakan *colony counter*.
14. *Streaking* atau penggoresan bahan dari seluruh tabung reaksi dilakukan ke dalam *Saboroud Dextrose Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
15. Setelah 18-24 jam, jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dihitung dengan *colony counter*. Kadar atau konsentrasi terendah dengan ditunjukkan jumlah koloni < 0,1% *original inoculum* merupakan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum).

Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

Keterangan: % : persentase konsentrasi akhir larutan ekstrak etanol biji jintan hitam sebelum ditambah fungi, KB : Kontrol Bahan, KF : Kontrol Fungi, OI : *Original Inoculum*, SDA : *Sabouraud Dextrose Agar*, KHM : kadar hambat minimum, KBM : kadar bunuh minimum, CFU : *Colony Forming Unit*.

4.9 Analisis Data

Berdasarkan data yang diperoleh, maka dapat dibuat grafik yang menggambarkan adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap jumlah koloni fungi yang tumbuh pada media SDA. Analisis data menggunakan program SPSS versi 20.0 untuk *Windows*. Urutan pengujian statistik adalah sebagai berikut (Syahdrajat, 2018):

1. Uji Normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data mengikuti distribusi normal atau tidak. Data berdistribusi normal ketika $p > 0,05$.
2. Uji Homogenitas bertujuan untuk menguji asumsi homogenitas varian. Homogen ketika $p > 0,05$.
3. Uji *One-way ANOVA* digunakan untuk membandingkan rata-rata lebih dari dua kelompok. Syarat dilakukan uji *one way ANOVA* adalah data berdistribusi normal dan homogen. Uji ini dilakukan guna mengetahui variasi yang muncul pada setiap perlakuan. Signifikan apabila $p < 0,05$. Pada penelitian ini, uji statistik *one-way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$) dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap jumlah koloni *Candida albicans*.
4. Uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan. Signifikan apabila $p < 0,05$.
5. Uji Korelasi digunakan untuk mengetahui derajat kekuatan hubungan dan arah hubungan antara variabel dependen dan variabel independen.
6. Uji Regresi Linear Sederhana digunakan untuk membuat prediksi nilai suatu variabel dependen berskala numerik melalui satu atau beberapa variabel independen berskala numerik.

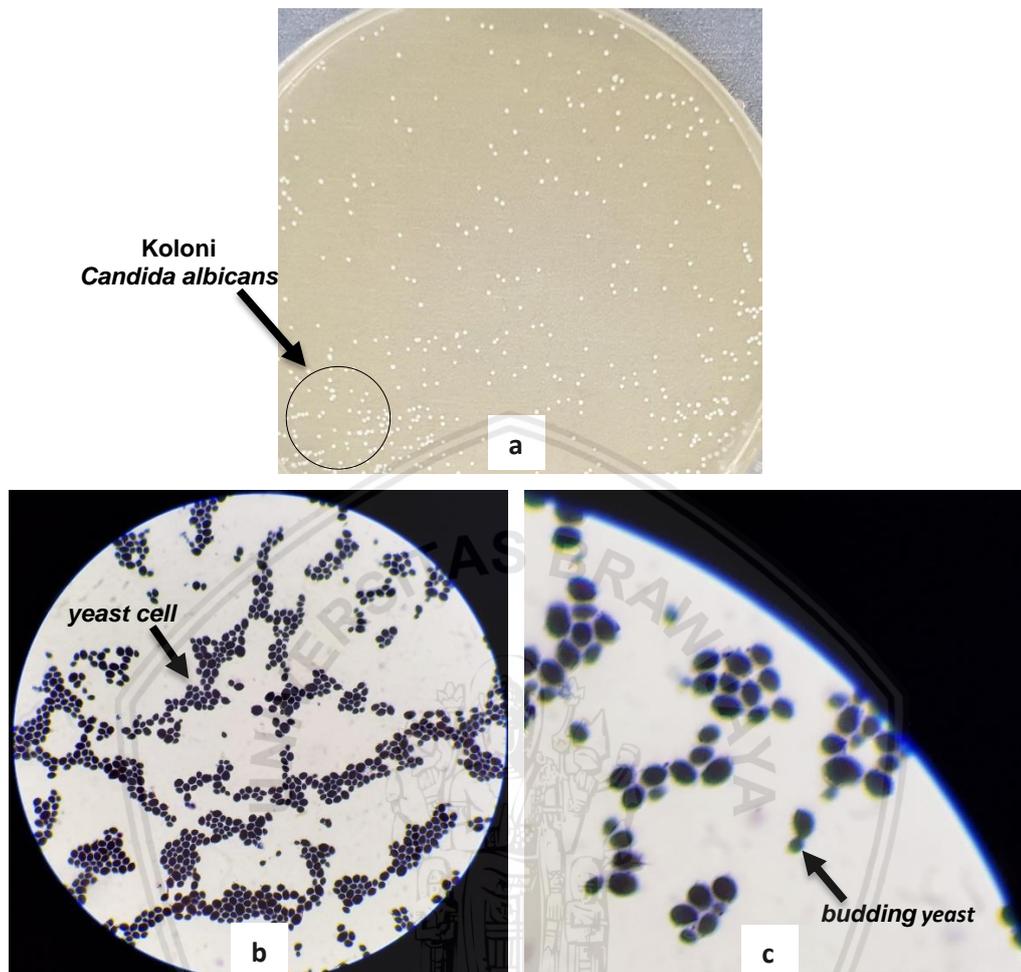
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Fungi *Candida albicans*

Fungi *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Prosedur identifikasi fungi diawali dengan proses *streaking* isolat *Candida albicans* di medium kultur *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil *streaking* pada SDA menunjukkan gambaran makroskopis berupa koloni berwarna putih krem dan berbentuk bulat cembung dengan permukaan yang terlihat licin dan lembut seperti pada Gambar 5.1 (a). Koloni berbau seperti ragi.

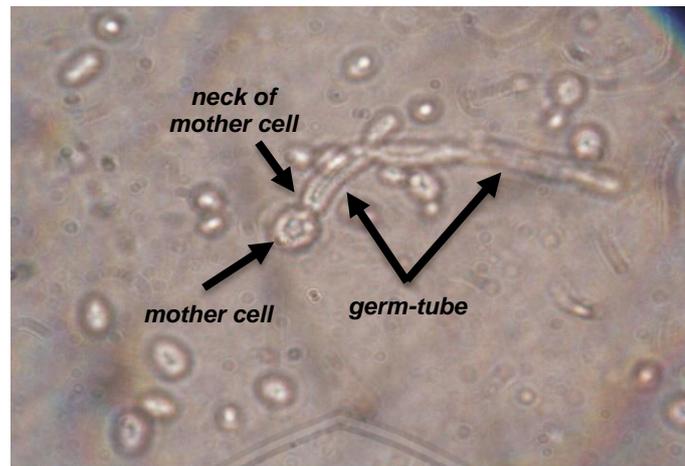
Langkah identifikasi selanjutnya adalah pewarnaan gram. Hasil pewarnaan gram diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran total 1000x dengan penambahan minyak imersi. Pada pengamatan diperoleh gambaran mikroskopis berupa bentuk bulat agak lonjong yang terlihat cenderung bergerombol dan berwarna ungu atau violet seperti ditunjukkan pada Gambar 5.1 (b). Warna ungu menunjukkan organisme gram positif. Pada hasil pengamatan, terlihat bentuk bulat agak lonjong yang merupakan *yeast cell* atau blastospora dan tampak *budding yeast*.



Gambar 5.1 Identifikasi Morfologi *Candida albicans*:

Keterangan: (a) Koloni *Candida albicans* di SDA berbentuk bulat cembung dan berwarna putih krem, (b) Gambaran mikroskopik organisme gram positif. Pada penampakan mikroskopik *Candida albicans* dapat diamati yeast cell, (c) Secara mikroskopik, tampak bentukan tunas yang disebut budding yeast.

Identifikasi *Candida albicans* dengan uji *Germ-tube* menggunakan serum mamalia. Tabung reaksi diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan uji *Germ-tube* di bawah mikroskop dengan perbesaran total 400x didapatkan gambaran *germ-tube*. *Germ-tube* merupakan awal mula dari hifa sejati seperti ditunjukkan pada Gambar 5.2. *Germ-tube* khas terdapat pada *Candida albicans*. *Germ-tube* merupakan perpanjangan filamen yeast cell tanpa disertai adanya konstiksi pada leher mother cell (Sudbery et al., 2004)

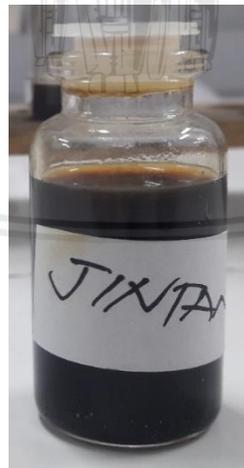


Gambar 5.2 Germ-tube pada *Candida albicans*

Keterangan: *Germ-tube test* dilakukan pada media serum mamalia yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Gambaran *germ-tube* ini membedakan spesies *Candida albicans* dengan spesies *Candida* yang lain.

5.2 Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) berwarna coklat pekat seperti pada gambar 5.3.



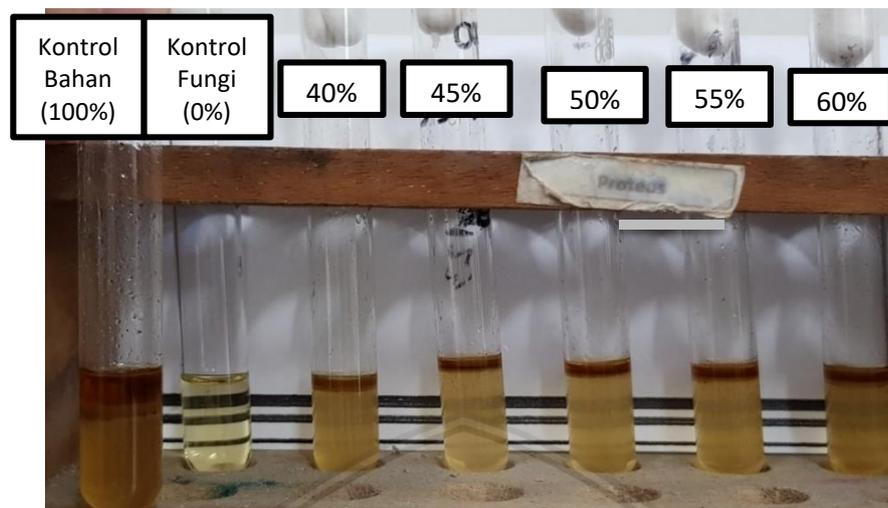
Gambar 5.3 Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn)

Keterangan: Ekstrak etanol biji jintan hitam sebanyak 10 mL dikemas dalam botol kaca kecil. Ekstrak berwarna coklat pekat. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

5.3 Hasil Pengamatan Kualitatif dan Analisis terhadap KHM

Metode dilusi tabung tahap pertama berupa pengujian di media cair untuk mengetahui KHM. Penelitian ini menggunakan lima konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn), yaitu 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60%, kontrol fungsi (0% ekstrak) serta kontrol bahan (100% ekstrak) dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Semua tabung reaksi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam kemudian diamati kekeruhan di setiap tabung reaksi. Kadar hambat minimal (KHM) merupakan konsentrasi terkecil dari agen antimikroba yang sudah mulai mampu menghambat pertumbuhan suatu mikroba dan ditunjukkan dengan tabung reaksi yang jernih. Apabila kekeruhan masih sama atau lebih keruh dibandingkan kontrol fungsi (0% ekstrak) berarti masih terdapat pertumbuhan jamur di tabung tersebut, namun apabila larutan terlihat mulai lebih jernih dibandingkan kontrol fungsi maka pertumbuhan jamur mulai terhambat dan hal tersebut diidentifikasi sebagai KHM (Ramschie *et al.*, 2017). Pada penelitian ini, kriteria larutan jernih (skor 0) adalah ketika ketiga garis yang memiliki ketebalan berbeda terlihat dengan jelas.

Pada hasil pengamatan kualitatif, didapatkan kekeruhan pada semua tabung reaksi seperti ditunjukkan pada Gambar 5.4, sehingga pada penelitian ini tidak dapat ditentukan adanya kadar hambat minimum (KHM). Nilai KHM tidak dapat dianalisis karena kekeruhan yang terjadi bukan disebabkan oleh pertumbuhan fungi *Candida albicans*, tetapi merupakan akibat dari warna asli ekstrak etanol biji jintan hitam yang keruh dan cenderung gelap.

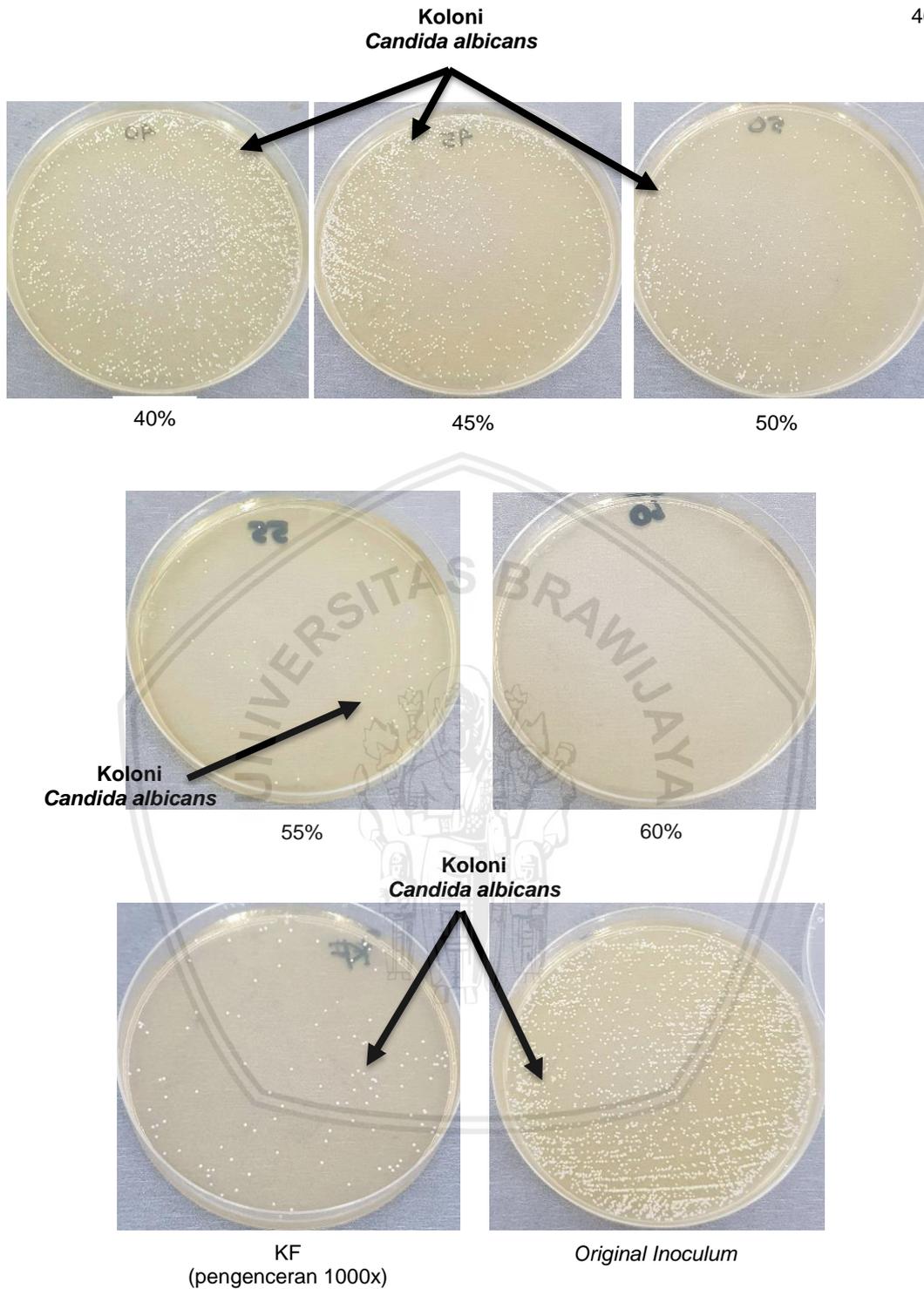


Gambar 5.4 Hasil Pengamatan Tingkat Kekeruhan pada Tabung Reaksi

Keterangan: Tabung reaksi dilusi menunjukkan kekeruhan pada semua konsentrasi perlakuan. Hal ini ditandai dengan 3 garis yang tidak dapat diamati secara jelas. Konsentrasi hambat minimum tidak dapat ditentukan karena kekeruhan bukan menandakan pertumbuhan fungi.

5.4 Hasil Pengamatan Kuantitatif dan Analisis terhadap KBM

Dilusi tabung tahap kedua adalah pengujian di media SDA untuk menentukan KBM. Isolat *Candida albicans* yang diberi ekstrak dengan berbagai konsentrasi tersebut telah diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37°C. Setiap campuran dalam tabung selanjutnya diinokulasikan pada SDA. Media kultur yang telah dilakukan *streaking* kemudian diinkubasi di suhu 37°C selama 18–24 jam. Hasil *streaking* di media SDA ditunjukkan pada Gambar 5.5. Jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh di media SDA dihitung menggunakan *colony counter*. Pengulangan penelitian sebanyak 4 kali. Kadar bunuh minimum atau *minimum fungicidal concentration* (MFC) merupakan konsentrasi terendah dari antifungi yang mampu mengeradikasi 99,9% dari *original inoculum* (Yamauchi, 2018). Kadar bunuh minimum diidentifikasi pada konsentrasi terendah ekstrak yang mampu membunuh >99,9% dari koloni *original inoculum* atau ditentukan ketika jumlah koloni <0,1% dari *original inoculum* (Caneschi et al., 2017).



Gambar 5.5 Hasil *Streaking* Campuran dari Tabung Reaksi Dilusi pada Media *Sabouraud Dextrose Agar*

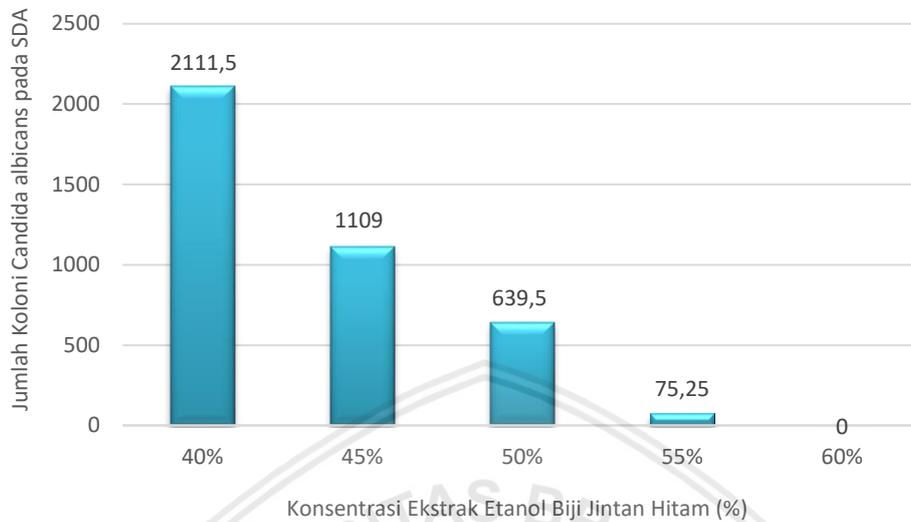
Keterangan: Koloni *Candida albicans* tampak berupa titik-titik bulat berwarna putih krem cembung. Hasil *streaking* menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni seiring peningkatan konsentrasi ekstrak sebagai perlakuan. Koloni fungi yang tumbuh sebagai *original inoculum* (OI) digunakan sebagai patokan dalam menentukan KBM.

Variasi konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam tampak mempengaruhi jumlah koloni fungi *Candida albicans* yang tumbuh pada media SDA. Penghitungan jumlah koloni fungi dilakukan menggunakan *colony counter* dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni *Candida albicans* yang Tumbuh pada Media *Sabouraud Dextrose Agar*

Konsentrasi Ekstrak	Jumlah Koloni pada Media <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>				Rata-rata
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4	
0% (KF)	119000	126000	132000	146000	130750
KB	0	0	0	0	0
40%	2096	2118	2127	2105	2111,5
45%	1098	1072	1112	1154	1109
50%	657	626	643	632	639,5
55%	83	79	89	50	75,25
60%	0	0	0	0	0
OI	2335	1997	2201	2217	2187,5

Berdasarkan Tabel 5.1 diketahui bahwa pada penelitian ini nilai KBM ditunjukkan pada konsentrasi ekstrak 60% karena jumlah koloni yang tumbuh <0,1% dari *original inoculum*. Pada Gambar 5.6 ditunjukkan grafik pengaruh variasi konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap rata-rata jumlah koloni fungi *Candida albicans* yang tumbuh di media SDA. Pada grafik terlihat penurunan jumlah koloni yang semakin drastis seiring peningkatan konsentrasi ekstrak.



Gambar 5.6 Grafik Jumlah Koloni *Candida albicans* terhadap Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam pada Media *Sabouraud Dextrose Agar*

Keterangan: Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam maka semakin sedikit jumlah koloni fungi *Candida albicans* yang tumbuh pada media *Sabouraud Dextrose Agar*.

5.5 Analisis Data

Analisis hasil penelitian ini menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 20.0 untuk *Windows*.

5.5.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Penelitian ini menggunakan uji analisa statistik *One-Way ANOVA*. Sebelum dilakukan uji analisa statistik, perlu dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Uji *Shapiro-Wilk* dipilih sebagai uji normalitas karena sampel yang digunakan berjumlah kurang dari 50 sampel (Dwipriastuti *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* (Lampiran 3.1) didapatkan nilai signifikansi pada konsentrasi ekstrak 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% adalah lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) sehingga dapat diketahui bahwa data penelitian berdistribusi normal.

Setelah mengetahui normalitas data, selanjutnya perlu dilakukan uji homogenitas.

Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji *Levene's Test*. Dari hasil uji homogenitas (Lampiran 3.2) diperoleh nilai signifikansi 0,079 ($p > 0,05$) sehingga dapat diketahui bahwa data penelitian bersifat homogen atau memiliki varian yang sama. Langkah selanjutnya dilakukan uji parametrik *one way ANOVA* karena dua syarat telah terpenuhi, yaitu data berdistribusi normal dan bersifat homogen. Uji lanjutan yang dilakukan setelah *one way ANOVA* adalah *Post hoc Tukey* untuk mengidentifikasi kelompok mana saja yang memiliki perbedaan secara signifikan (Octaviani dan Fadila, 2018).

5.5.2 Uji *One-Way ANOVA*

Berdasarkan uji parametrik *One-Way ANOVA* (Lampiran 4) diperoleh nilai signifikansi (Sig.) sebesar 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan pada setiap perubahan konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap jumlah koloni fungi yang tumbuh di media SDA pada taraf kepercayaan 95%. Dengan kata lain, pada hasil pengujian ini ($p < 0,05$) berarti ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dengan konsentrasi 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penurunan jumlah koloni fungi *Candida albicans*.

Selain itu, berdasarkan tabel *descriptive* (Lampiran 4) diketahui rata-rata jumlah koloni fungi pada kelima konsentrasi ekstrak. Secara deskriptif disimpulkan bahwa rata-rata jumlah koloni fungi tertinggi adalah pada konsentrasi ekstrak 40% yaitu 2111,50 dan rata-rata jumlah koloni terendah adalah pada konsentrasi ekstrak 60% yaitu 0.

5.5.3 Uji *Post Hoc* Tukey

Uji *Post hoc* Tukey merupakan uji lanjutan dari *one way ANOVA* yang dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi kelompok mana saja yang memiliki perbedaan secara signifikan (Octaviani dan Fadila, 2018). Berdasarkan hasil uji *Post hoc* Tukey (Lampiran 5) diperoleh perbandingan rata-rata jumlah koloni fungi pada setiap konsentrasi ekstrak. Angka perbedaan rata-rata untuk jumlah koloni fungi pada konsentrasi ekstrak 40% dan 45% adalah 1002,50, pada konsentrasi ekstrak 40% dan 50% adalah 1472,00, pada konsentrasi ekstrak 40% dan 55% adalah 2036,25, pada konsentrasi ekstrak 40% dan 60% adalah 2111,50, pada konsentrasi ekstrak 45% dan 50% adalah 469,50, pada konsentrasi 45% dan 55% adalah 1033,75, pada konsentrasi ekstrak 45% dan 60% adalah 1109,00, pada konsentrasi ekstrak 50% dan 55% adalah 564,25, pada konsentrasi ekstrak 50% dan 60% adalah 639,50, dan pada konsentrasi 55% dan 60% adalah 75,25.

Untuk menguji adanya perbedaan rata-rata jumlah koloni fungi antara dua konsentrasi maka perlu diperhatikan nilai signifikansi hasil *output* SPSS pada tabel *Multiple Comparisons* kolom nilai signifikansi (Sig.). Berdasarkan tabel tersebut diketahui nilai signifikansi antara konsentrasi ekstrak 40% dan 45% adalah 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa jumlah koloni fungi pada konsentrasi ekstrak 40% dan 45% adalah berbeda, sehingga perbedaan rata-rata jumlah koloni fungi secara deskriptif antara kedua konsentrasi tersebut signifikan atau nyata. Nilai signifikansi pada konsentrasi ekstrak yang lain dapat dilihat pada tabel *Multiple Comparisons* (Lampiran 5). Perbedaan rata-rata jumlah koloni fungi antara dua konsentrasi ekstrak masing-masing menunjukkan nilai

signifikansi (Sig.) sebesar 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat disimpulkan perbedaan rata-rata jumlah koloni *Candida albicans* pada setiap konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) adalah berbeda secara nyata atau signifikan.

Kesamaan rata-rata jumlah koloni fungi pada kelima konsentrasi ekstrak dapat diidentifikasi dengan melihat *output Homogeneous Subsets* (Lampiran 5). Berdasarkan tabel *Homogeneous Subsets* diketahui bahwa dalam ke-5 kolom *subset* masing-masing hanya memiliki 1 data mengenai rata-rata jumlah koloni fungi, sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata jumlah koloni fungi pada setiap konsentrasi ekstrak yaitu 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% mempunyai perbedaan yang signifikan.

5.5.4 Uji Korelasi dan Regresi

Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui tingkat keeratan hubungan antara variabel bebas yaitu konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam dan variabel terikat yaitu jumlah koloni *Candida albicans* yang dinyatakan dengan koefisien korelasi (r). Hasil uji korelasi *Pearson* (Lampiran 6.1) menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat diketahui bahwa terdapat hubungan antara jumlah koloni fungi dengan perlakuan berupa pemberian ekstrak dalam berbagai konsentrasi. Nilai *Pearson Correlation* (r) menunjukkan angka -0,959 maka dapat diketahui bahwa jumlah koloni fungi berhubungan terhadap konsentrasi ekstrak pada derajat korelasi sangat kuat karena nilai berkisar antara 0,900 sampai dengan 1,000 (Guilford, 1942). Tanda negatif pada nilai *Pearson Correlation* menunjukkan hubungan yang berkebalikan, artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin sedikit jumlah koloni fungi yang tumbuh.

Uji Regresi Linear Sederhana digunakan untuk menguji pengaruh satu variabel bebas terhadap variabel terikat. Pada penelitian ini, uji regresi digunakan untuk membuat prediksi nilai suatu variabel dependen yaitu jumlah koloni fungi melalui variabel independen yaitu konsentrasi ekstrak. Hasil uji regresi linear sederhana (Lampiran 6.2) menunjukkan beberapa tabel *output*. Tabel pertama adalah tabel *Variables Entered/Removed* yang menjelaskan tentang variabel bebas (*independent variable*) yaitu konsentrasi ekstrak dan variabel terikat (*dependent variable*) yaitu jumlah koloni fungi. Kedua adalah tabel *Model Summary* yang menjelaskan mengenai nilai korelasi/hubungan (R) sebesar 0,959 sehingga dapat diketahui bahwa pada penelitian ini terdapat hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat sebesar 0,959. Koefisien determinasi (*R Square*) menunjukkan angka 0,919, artinya pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni fungi adalah sebesar 91,9%. Ketiga adalah tabel ANOVA yang menjelaskan mengenai nilai F hitung sebesar 204,069 dan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti ada pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni fungi. Tabel keempat adalah tabel *Coefficients* yang menjelaskan nilai *Constant (a)* sebesar 6043,800 dan nilai koefisien regresi/b (konsentrasi ekstrak) sebesar -105,135 sehingga dapat ditulis persamaan regresi sebagai berikut.

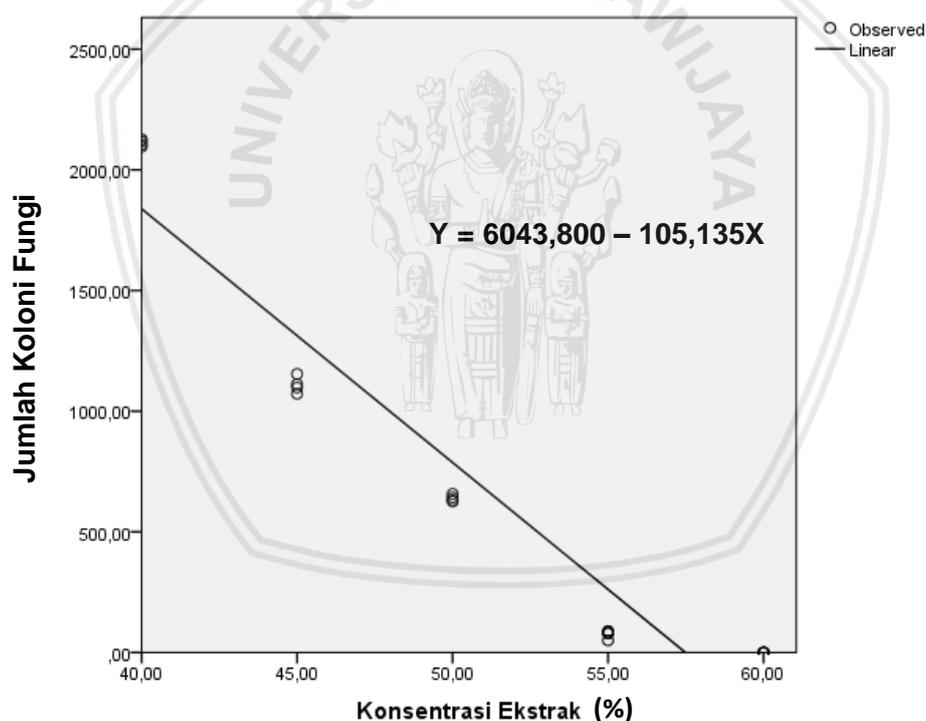
$$Y = a + bX$$

$$Y = 6043,800 + (-105,135)X$$

$$Y = 6043,800 - 105,135X$$

Persamaan tersebut memiliki arti bahwa nilai konsisten jumlah koloni fungi adalah sebesar 6043,800. Koefisien regresi sebesar -105,135 memberikan informasi bahwa setiap penambahan 1% nilai konsentrasi ekstrak, maka nilai

jumlah koloni fungi akan berkurang sebesar 105,135. Koefisien regresi bernilai negatif, sehingga dapat dikatakan bahwa arah pengaruh variabel X yaitu konsentrasi ekstrak etanol biji jintan hitam terhadap variabel Y yaitu jumlah koloni fungi *Candida albicans* adalah negatif. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa apabila tanpa pemberian ekstrak etanol biji jintan hitam maka jumlah pertumbuhan koloni fungi *Candida albicans* akan meningkat sebesar 6043,800 secara konstan. Grafik persamaan regresi linear sederhana pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Grafik Persamaan Regresi Linear Sederhana

Keterangan: Persamaan regresi linear grafik tersebut adalah $Y = 6043,800 - 105,135X$.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan penelitian pendahuluan untuk memperoleh konsentrasi perlakuan. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan metode *serial dilution*, yaitu 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, dan $\frac{1}{32}$. Pengenceran menggunakan pelarut aquades. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan diketahui bahwa pada konsentrasi berlabel $\frac{1}{2}$ atau 50% didapatkan penurunan jumlah koloni yang sangat drastis dan pada konsentrasi berlabel 1 atau 100% tidak didapatkan pertumbuhan koloni fungi pada medium SDA (Lampiran 1). Kemudian dilakukan perapatan konsentrasi dengan selisih 5% untuk penelitian ini, yaitu 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60%.

Berdasarkan hasil pengamatan setelah pemberian konsentrasi perlakuan menggunakan konsentrasi perapatan dan diinkubasi selama 18-24 jam, didapatkan bahwa semua tabung dilusi menunjukkan kekeruhan, sehingga pada penelitian ini tidak dapat ditentukan adanya KHM. Kadar hambat minimum tidak dapat dianalisis berdasarkan tingkat kekeruhan karena kekeruhan tersebut bukan disebabkan oleh pertumbuhan fungi melainkan disebabkan oleh warna asli ekstrak etanol biji jintan hitam yang keruh dan cenderung gelap. Penyebab dari kekeruhan ini diduga adalah senyawa saponin yang terkandung dalam biji jintan hitam. Beberapa senyawa saponin memiliki sifat asam karena terdapat gugus karboksil pada aglikon dan atau gugus gula. Perlakuan asam yang berlebihan dapat meningkatkan kelarutan protein, karena ion positif pada asam yang

membuat protein semula bermuatan netral (nol) menjadi bermuatan lebih positif, sehingga kelarutan juga semakin meningkat dan efeknya ditunjukkan dengan tabung yang menjadi keruh. Jadi, perbedaan tingkat kekeruhan bukan dikarenakan ada atau tidaknya pertumbuhan fungi tetapi karena konsentrasi ekstrak. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi pula tingkat kekeruhan (Achwandi *et al.*, 2015). Selain itu, mutu ekstrak dapat dipengaruhi oleh faktor biologi meliputi jenis tanaman, lokasi tanaman tumbuh, periode pemanenan hasil tanaman, penyimpanan bahan tanaman, usia tanaman dan bagian yang digunakan, serta proses pengeringan. Faktor kimia terdiri dari faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal meliputi senyawa aktif dalam bahan, komposisi kuantitatif dan kualitatif senyawa aktif, serta kadar total rata – rata senyawa aktif. Faktor eksternal terdiri dari metode ekstraksi, perbandingan ukuran alat ekstraksi, ukuran dan kekerasan bahan, pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, dan kandungan pestisida dalam bahan tanaman (Depkes RI, 2000).

Tahap kedua dari metode dilusi tabung adalah pengujian pada media SDA. Berdasarkan hasil penggoresan pada media SDA dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C diketahui bahwa pada konsentrasi ekstrak 60% tidak didapatkan pertumbuhan koloni fungi. Hasil penghitungan koloni fungi menggunakan *colony counter* pada konsentrasi ekstrak 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% ditunjukkan pada Tabel 5.1. Pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Berdasarkan hasil penghitungan koloni dapat disusun grafik yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah koloni yang signifikan seperti ditunjukkan pada Gambar 5.6. Kadar bunuh minimum ditetapkan ketika jumlah koloni yang tumbuh pada SDA berjumlah <0,1% dari *original inoculum*.

Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diketahui bahwa nilai KBM ditemukan pada konsentrasi ekstrak 60% dengan tidak ditemukan pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada medium SDA.

Berdasarkan beberapa literatur diketahui bahwa jintan hitam sering digunakan sebagai bumbu dapur dan obat. Pemanfaatan tanaman tradisional dianggap lebih aman selama digunakan dengan cara yang benar, dosis yang tepat dan indikasi yang tepat (Permatasari *et al.*, 2016). Senyawa *thymoquinone* dan *thymohydroquinone* yang terdapat di dalam minyak atsiri biji jintan hitam memiliki aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* (Rahmawati *et al.*, 2012). Kandungan dari ekstrak etanol biji jintan hitam yang paling utama adalah *thymoquinone*. *Thymoquinone* adalah senyawa golongan monoterpen (Permatasari *et al.*, 2016).

Penelitian di Turki pada tahun 2016 menguji efek *thymoquinone* (TQ) secara *in vitro* terhadap 14 *strain* dari *Candida* dengan metode *microdilution broth*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut ditunjukkan bahwa pertumbuhan *Candida* yang bersifat patogen mampu dihambat oleh senyawa *thymoquinone* pada konsentrasi 62 sampai 7 $\mu\text{m}/\text{mL}$ (KHM) seperti ditunjukkan pada Tabel 6.1 di bawah ini (Iscan *et al.*, 2016).

Sementara itu, penelitian pada tahun 2012 menunjukkan bahwa infusa jintan hitam yang diperoleh dengan cara direbus selama 15 menit pada suhu 90°C memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *Candida albicans* (Rahmawati *et al.*, 2012). Penelitian tahun 2015 menunjukkan bahwa ekstrak biji jintan hitam memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro* dengan ditunjukkan adanya diameter daerah hambat untuk konsentrasi 60% adalah 21,67 mm dan nilai KHM sebesar 32% (Dharma dan Subaryanti, 2015).

Berdasarkan hasil penelitian di Maroko tahun 2014, ekstrak biji jintan hitam memiliki efek terhadap *Candida albicans*. Biji jintan hitam juga memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri, seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis* (Benlafya *et al.*, 2014). Oleh karena itu, biji jintan hitam merupakan tanaman herbal yang memiliki banyak manfaat sebagai antimikroba.

Berdasarkan penelitian di Iran tahun 2017, terdapat 3 tanaman yang diuji efektivitasnya sebagai antimikroba terhadap *Candida*, yaitu jintan hitam (*Nigella sativa*), tanaman adas (*Foeniculum vulgare*), dan tanaman teh (*Camellia sinensis*). Berdasarkan hasil penelitian tersebut diketahui bahwa jintan hitam (*Nigella sativa*) dan tanaman adas (*Foeniculum vulgare*) memiliki efek antifungi terhadap strain *Candida*, sedangkan *Camellia sinensis* tidak memiliki efek anti-*Candida*. Aktivitas anti-*Candida* terbaik ditemukan pada *Nigella sativa* kemudian diikuti dengan *Foeniculum vulgare*. Diketahui bahwa *Nigella sativa* memiliki efek antifungi terhadap *Candida* lebih baik daripada *Foeniculum vulgare* maupun *Camellia sinensis* (Naeini, *et al.*, 2017). Penelitian tersebut mendukung hasil penelitian ini. Berdasarkan penelitian tersebut, semakin mendukung bahwa biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

Ekstrak etanol biji jintan hitam mengandung senyawa kimia utama yaitu *thymoquinone*. *Thymoquinone* adalah senyawa golongan monoterpen. Karakteristik dari ekstrak ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa lain seperti senyawa kimia golongan saponin, fenol, alkaloid, dan flavonoid yang diduga mempunyai khasiat sebagai antijamur (Permatasari *et al.*, 2016).

Mekanisme aksi monoterpen belum dapat dijelaskan secara pasti. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa monoterpen mampu merusak sitoplasma dan membran organela. Hilangnya integritas membran menyebabkan perubahan fungsi membran sehingga mengarah pada mekanisme kerja suatu antifungi. Penelitian lain menyebutkan bahwa mekanisme kerja monoterpen berkaitan dengan *ergosterol-binding* dan destabilisasi membran sel jamur (Miron *et al.*, 2014). Mekanisme kerja dari fenol adalah melakukan denaturasi protein sel yaitu mengubah rumus bangun sehingga sifat khasnya hilang (Dharma dan Subaryanti, 2015). Mekanisme fenol sebagai antimikroba adalah dengan merusak dan menembus dinding sel, merusak protoplasma, mengendapkan protein sel mikroba, dan denaturasi enzim (Rahmawati *et al.*, 2012). Saponin sebagai antifungi bekerja dengan cara membuat lubang pada membran fungi sehingga fungsi akan kehilangan integritas membran (Turk, 2006).

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

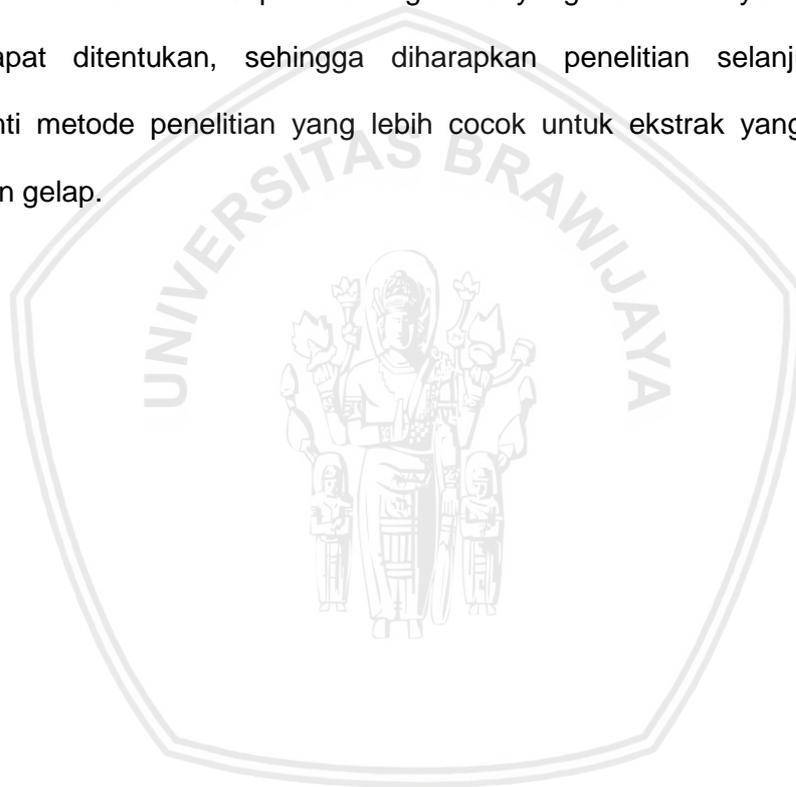
Berdasarkan analisis data dapat diketahui bahwa ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) memberikan efek antifungi terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*. Hasil penelitian dan analisis data ini didukung dengan beberapa penelitian terdahulu yang membuktikan adanya efek biji jintan hitam terhadap *Candida albicans*.

Penelitian ini masih sebatas penelitian yang dilakukan secara *in vitro* di dalam laboratorium sehingga hasilnya belum dapat diaplikasikan langsung secara klinis pada manusia yang menderita suatu penyakit akibat *Candida albicans*.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini antara lain batas waktu maksimal penyimpanan dan penggunaan ekstrak etanol biji jintan hitam belum diketahui secara jelas, semakin lama penyimpanan ekstrak maka kemungkinan terjadinya penurunan potensiasi ekstrak semakin besar.

Keterbatasan lain seperti tabung dilusi yang keruh menyebabkan KHM tidak dapat ditentukan, sehingga diharapkan penelitian selanjutnya bisa mengganti metode penelitian yang lebih cocok untuk ekstrak yang warnanya keruh dan gelap.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis data, dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.
- b. KHM pada *Candida albicans* menggunakan ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) tidak dapat ditentukan karena warna ekstrak keruh dan cenderung gelap, sementara KBM ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap *Candida albicans* ditemukan pada konsentrasi ekstrak 60% dengan ditandai tidak ada pertumbuhan koloni fungi pada media *Sabouraud Dextrose Agar*.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti adalah:

- a. Diperlukan pengujian dengan metode lain apabila ekstrak yang digunakan berwarna keruh dan cenderung gelap.
- b. Diperlukan pengujian kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) sebelum melakukan penelitian.
- c. Diperlukan penelitian lanjutan terkait ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) dan fungi *Candida albicans* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

- d. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai dosis efektif, dosis toksik, dan efek samping dari penggunaan ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* Linn) sehingga dapat diaplikasikan secara klinis pada manusia di masa yang akan datang.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah E.M. 2017. Black Seed (*Nigella sativa*) As Antimicrobial Drug : A Mini Review. *Novel Approaches in Drug Designing and Development*, 3(2): 1-4.
- Achwandi, M., Azizah K. dan Soewito. 2015. Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum Bakteri *Salmonella typhi*. *Muhammadiyah Journal of Nursing*, hal. 1-8.
- Anggraini, V. dan Masfufatun M. 2017. Efektivitas Kombinasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida albicans*. *Jurnal Kimia Riset*, 2(2): 86-92.
- Anisah, Siti K. dan Ari H.Y. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Protobiont*, 3(3): 1-5.
- Bates, S. and Rosa JM. 2007. *Candida albicans* Iff11, A Secreted Protein Required for Cell Wall Structure and Virulence. *J Infect and Immune*, 75(6): 2922-2928.
- Bouwmeester H.J., Jonathan G., Maurice C.J.M.K., and Rodney C. 1998. Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. *Plant Physiology*, 117(3): 901-912.
- Brooks, G. F., Karen C.C., Janet S.B., Stephen A.M., and Timothy A.M. 2010. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 25th Ed. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 25. Aryandhito W.N., et al. (penerjemah). Jakarta : Buku Kedokteran EGC, hal. 362, 674, 675-676, 677.
- Benlafya, K., Khalid K., Yassine C., Miloud E.K and Youssef R. 2014. Antimicrobial Activity of Aqueous, Ethanolic, Methanolic, Cyclohexanic Extracts and Essential Oil of *Nigella sativa* Seeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(8): 9-11.
- Candrasari, D.S. 2014. Kajian Molekuler Resistensi *Candida albicans* terhadap Antifungi. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 11(1): 43-48.
- Caneschi, C.A., Angelina M.D.A, Francislene J.M., Mireille L.H., Manoel M.E.O., Gilson C.M., et al. 2017. *In Vitro* Antifungal Activity of Organic Compounds Derived From Amino Alcohols Against Onychomycosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3): 476-482.



- Darma M., Sartiah Y. dan Andi F.F. 2017. Hubungan Pengetahuan *Vulva Hygiene*, Stres, dan Pola Makan dengan Kejadian Infeksi *Flour Albus* (Keputihan) pada Remaja Siswi SMA Negeri 6 Kendari 2017. *JIMKESMAS*, 2(6): 1-9.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Departemen Kesehatan RI, Jakarta, halaman 7-8, 10-11.
- Dewi S.S. dan Tulus A. 2010. Efektifitas *Virgin Coconut Oil* (VCO) terhadap Kandidiasis secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 1(1): 39-41.
- Dharma, S.T. dan Subaryanti. 2015. Uji Anti Jamur Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap *Candida albicans*. *Sainstech Farma*, 8(2): 28-32.
- Dwipriastuti, D., R. Rama P. dan Welly A. 2017. Perbedaan Efektivitas Chlorhexidine Glukonat 0,2% dengan Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Jumlah *Porphyromonas gingivalis*. *ODONTO Dental Journal*, 4 (1): 50-54.
- Gow N.A.R and Bhawna Y. 2017. Microbe Profile: *Candida albicans*: A Shape-Changing, Opportunistic Pathogenic Fungus of Humans. *Microbiology Society*, 163: 1145-1147.
- Greenwood, D., Mike B., Richard S. and Will I. 2012. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infection: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control, 18th Ed. Churchill Livingstone Elsevier, China, p. 623-625, 637.
- Guilford, J.P. 1942. Fundamental Statistic in Psychology and Education. New York, NY, US: McGraw-Hill. p. 218-219.
- Gustiana, Alexander R. dan Elmi N.Z. 2015. Efektivitas Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap Infeksi Bakteri *Streptococcus agalactie* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Linn). *Torani*, 25(1): 26-31.
- Iscan, G., Arzu I., dan Fatih D. 2016. Anticandidal Effects of Thymoquinone: Mode of Action Determined by Transmission Electron Microscopy (TEM). *Natural Product Communications*, 11(7): 977-978.
- Islam, M.T., Bishwajit G., Sajjad H., Thoufiqul A.R., Sarrin S., Leonardo da R.S., et al. 2017. Nigellalogy: A review on *Nigella sativa*. *MOJ Bioequivalence & Bioavailability*, 3(6): 167-181.
- Jessica P., Widyawati, dan Desy A. 2016. Hubungan Antara Terjadinya Kandidiasis Vulvovaginalis dengan Penggunaan Kontrasepsi Hormonal. *JKD*, 5(4): 1493-1499.

- Kalista K.F., Lie K.C., Retno W. dan Cleopas M.R. 2017. Karakteristik Klinis dan Prevalensi Pasien Kandidiasis Invasif di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, 4(2): 56-61.
- Katzung, B.G., Susan B.M., dan Anthony J.T. 2013. Farmakologi Dasar & Klinik Vol. 2, Edisi 12. EGC, Jakarta. hal. 963, 965, 968.
- Kayser, F.H., Kurt A.B., Jihannes E., and Rolf M. Z. 2005. Medical Microbiology. Thieme Stuttgart, New York, p. 362-364.
- Kellner, E.M., Orsbon Kl., and Siegel EM. 2005. *Coccidioides posadasii* Contains A Single 1,3- β -glucan Synthase Gene That Appears To Be Essential For Growth. *American Society for Microbiology*, 4(1): 111-120.
- Kementerian Kesehatan RI. 2004. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 131/MENKES/SK/II/2004 tentang Sistem Kesehatan Nasional. Jakarta : Warta Perundang-undangan, hal. V-1 – V-9.
- Kementerian Kesehatan RI. 2007. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 381/MENKES/SK/III/2007 tentang Kebijakan Obat Tradisional Nasional. Jakarta : Warta Perundang-undangan, hal. 1-27.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. *Pedoman Nasional Penanganan Infeksi Menular Seksual 2015*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI, hal. 39.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI, hal. 138-142.
- Kusumaputra, B.H. dan Iskandar Z. 2014. Penatalaksanaan Kandidiasis Mukokutan pada Bayi. *BIKKK*, 26(2): 139-145.
- Lestari, P.E. 2010. Peran Faktor Virulensi pada Patogenesis Infeksi *Candida albicans*. *Stomatognatic (J.K.G Unej)*, 7(2): 113-117.
- Mamuaja, E.H., Ratna I.S., Pieter L.S., dan Grace M.K. 2017. Onikomikosis Kandida yang Diterapi dengan Itrakonazol Dosis Denyut. *Jurnal Biomedik*, 9(3): 178-183.
- Mayer, F.L., Duncan W., and Bernhard H. 2013. *Candida albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Landes Bioscience*, 4(2): 119-128.
- Mazu, T.K., Barbara A.B., Hernan F.R., and Seth Y.A. 2016. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *HHS Public Access*, 16(7): 555-578.
- Miro, M.S., Rodriguez E., Vigezzi C., Icely P.A., Riera F., Caeiro J.P., et al. 2018. β -glucans Composition in *Candida albicans* Wall is Relevant to Promote Inflammatory Reaction During The Curse of Vulvovaginal Candidiasis. *International Journal of Infectious Diseases* 73S, 73(1): 114-115.

- Miron, D., Fernanda B., Fernanda K.S., Aline D.L., Bruna P., Bruna C., *et al.* 2014. Antifungi Activity and Mechanism of Action of Monoterpenes Against Dermatophytes and Yeast. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24(6): 660-667.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361-367.
- Murray, P.R., Ken S.R., and Michael A.P. 2013. *Medical Microbiology*, 7th Ed. China : Elsevier Inc, p. 631, 632, 633, 642.
- Mutiawati, V.K. 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi pada *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 16(1): 53-63.
- Naeini, A., Seyed-Shojaddin S., Hojjatollah S., Ali D., Ali K. and Abdollah A. 2017. In Vitro Antifungal Effect of Herbal Mixture (*Nigella sativa*, *Foeniculum vulgare*, and *Camellia sinensis*) Against *Candida* Species Isolated from Denture Wearers. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 6(2): 74-79.
- Noorhamdani, Sanarto S., Sumarno, Sri W., Dwi Y.N.H., Yuanita M., *et al.* 2017. Student Guidance for Practical Work. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Brawijaya University, hal. 14-16, 37.
- Octavia, D.R. 2009. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah, halaman 9-12.
- Octaviani, M. dan Fadila. 2018. Uji Aktivitas Antijamur Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Katalisator*, 3(2): 125-133.
- Permatasari, R.A., Lanny M., dan Endah R. 2016. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*. *Prosiding Farmasi*, hal. 280-285.
- Poeloengan, M., Andriani, Susan M.N., Iyep K., dan Mirza H. 2007. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Largerstoremia speciosa* Pers) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *In Vitro*. *Teknologi Peternakan dan Veteriner*, hal. 776-782.
- Pulungan, A.S.S. 2017. Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Daun Kunyit (*Curcuma longa* LINN) terhadap Jamur *Candida albicans*. *BIOLINK*, 3(2): 120-124.
- Puspitasari, G., Sri M., dan Herawati. 2012. Uji Daya Antibakteri Perasan Buah Mengkudu Matang (*Morinda citrifolia*) terhadap Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) M.2036.T *In Vitro*. *Jurnal Veteriner*, 1(1): 1-7.

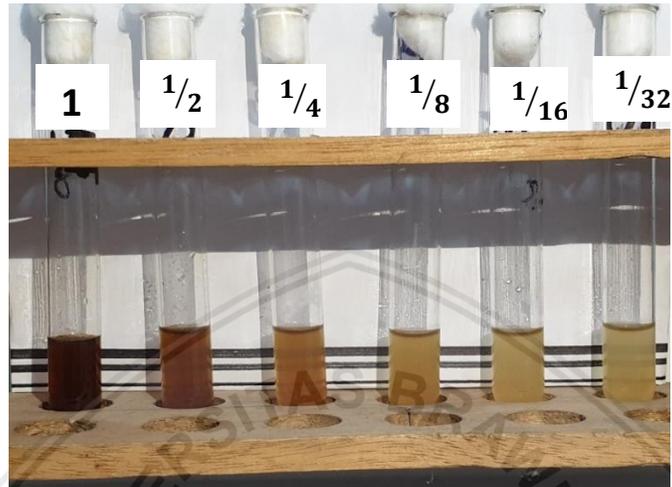
- Rahmawati, A., Nurcholis A., dan Retno S. 2012. Pengaruh Pemberian Infusa Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn) terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. *Analisis Kesehatan Sains*, 1(1): 16-20.
- Ramschie, L.M.L., Pieter L.S., dan Krista V.S. 2017. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap *Candida albicans* secara *In Vitro*. *Jurnal e-GiGi*, 5(2): 184-189.
- Reza N.R., Tantari SHW., dan Santosa B. 2017. Uji Kepekaan *In Vitro* Flukonazol terhadap Spesies *Candida* Penyebab Kandidiasis Oral pada Pasien HIV/AIDS dengan Vitek II. *BIKKK*, 29(3): 234-242.
- Rezeki, S., Santi C., dan Aulia I. 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*, *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 2(1): 52-62.
- Rintiswati, N., Winarsih N.E dan Malueka R.G. 2004. Potensi Antikandida Ekstrak Madu secara *In Vitro* dan *In Vivo*. *Berkala Ilmu Kedokteran*, 36(4): 187-194.
- Rumampuk, I.M.A., Lydia T., dan Grace L.A.T. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok. *Jurnal e-Biomedik*, 4(1): 199-204.
- Safithri, F. 2017. Potensi Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dalam Regenerasi Pankreas secara Endogen pada Diabetes Mellitus Tipe-2. *Saintika Medika*, 13(2): 76-87.
- Saifudin, A. 2011. *Standardisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu, halaman 1-11.
- Septiana, A.T dan Ari A. 2012. Kajian Sifat Fitokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *AGROINTEK*, 6(1): 22-28.
- Seru R.S., Pieter L.S., dan Herry E.J.P. 2013. Profil Kandidiasis Kutis di Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUP Prof.Dr.R.D.Kandou Manado Periode 2009 – 2011. *Jurnal e-Biomedik*, 1(1): 561-565.
- Soetojo, S.D.R. dan Linda A. 2016. Profil Pasien Baru Infeksi Kandida pada Kulit dan Kuku. *BIKKK*, 28(1): 34-41.
- Sudbery, P., Neil G., and Judith B. 2004. The Distinct Morphogenic States of *Candida albicans*. *TRENDS in Microbiology*, 12(7): 317-324.
- Sultana, S., Hafiz M.A., Naheed A., Asif I., Haleema N., and Riaz U.R. 2015. *Nigella sativa*: Monograph. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4): 103-106.

- Syahdrajat, T. 2018. Panduan Penelitian untuk Skripsi Kedokteran dan Kesehatan. Centro Offset, Jakarta, hal. 43-45, 91-97, 120-121.
- Tudela, J.L.R., Manuel C.E., Teresa M.D.G., and Emilia M. 2001. Standardization of Antifungal Susceptibility Variables for a Semiautomated Methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7): 2513-2517.
- Turk, F.M. 2006. Saponins versus Plant Fungal Pathogens. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5: 13-17.
- Umeyama, T. and Kaneko A. 2006. Deletion of The CaBIG1 Gene Reduces β -1,6-glucan Synthesis, Filamentation, Adhesion, and Virulence in *Candida albicans*. *J Infect and Immune*, 74(4): 2373-2381.
- WHO. 2009. Laboratory Manual for Diagnosis of Fungal Opportunistic Infection In HIV/AIDS Patients. Mahatma Gandhi Marg, New Delhi, hal 78-83.
- Yamauchi, P.S. 2018. Biologic and Systemic Agents in Dermatology. Springer International Publishing AG, Switzerland, p. 428.
- Yugo M.R. dan Ridhawati. 2013. Pola Kepekaan *Candida albicans* terhadap Flukonazol dan Itrakonazol secara *In Vitro*: Tinjauan pada Bahan Klinik Laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI Periode 2010-2011. *Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*, hal. 1-13.
- Zhang J.D., Zheng X., Yong B.C., Hai S.C., Lan Y., Mao M.A., *et al.* 2006. Antifungal Activities and Action Mechanisms of Compound from *Tribulus terrestris* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1): 76-84.

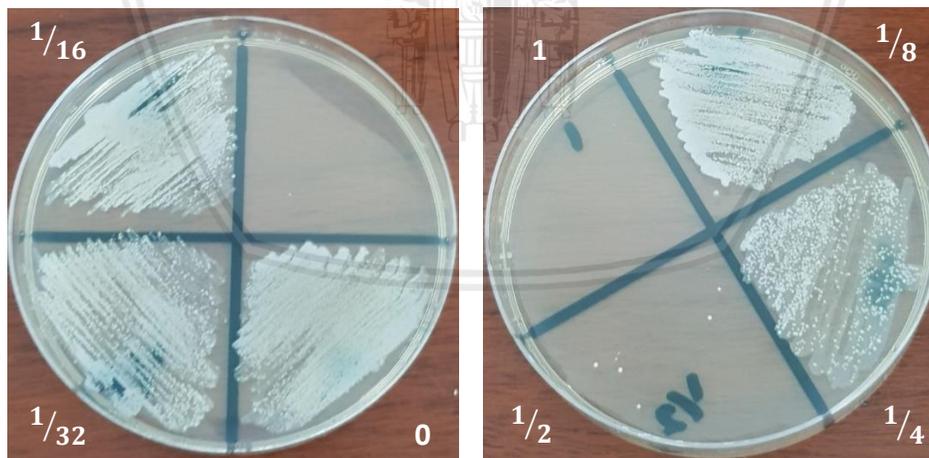
LAMPIRAN I

HASIL PENELITIAN PENDAHULUAN

1.1 Hasil Identifikasi Kekeruhan Tabung Dilusi



Keterangan: penelitian pendahuluan menggunakan *serial dilution* dengan konsentrasi ekstrak 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ dan $\frac{1}{32}$. Hasil identifikasi kekeruhan tabung dilusi setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam adalah keruh pada semua tabung. Hasil menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin keruh.

1.2 Hasil *Streaking* Campuran pada Medium *Sabouraud Dextrose Agar*

Keterangan: konsentrasi ekstrak 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ dan $\frac{1}{32}$ dari tabung dilusi diinokulasikan pada medium SDA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil *streaking* menunjukkan penurunan jumlah koloni yang sangat drastis pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ (50%) dan tidak ditemukan pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak 1 (100%).

LAMPIRAN II

ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

2.1 Alat Penelitian



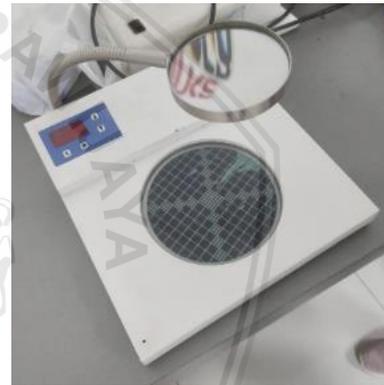
Tabung Reaksi berfungsi sebagai wadah campuran *liquid* dan Rak Tabung Reaksi berfungsi sebagai tempat tabung reaksi.



Penggaris, Spidol, dan Kertas Label berfungsi untuk melabeli tabung reaksi dan *plate* SDA.



Vortex berfungsi menghomogenkan campuran *liquid* di dalam tabung reaksi.



Colony counter berfungsi untuk menghitung jumlah koloni fungi yang tumbuh di media *Sabouraud Dextrose Agar*.



Spektrofotometri berfungsi untuk mengukur kepadatan atau konsentrasi sampel secara kuantitatif, berdasarkan interaksi materi dengan cahaya.



Inkubator berfungsi untuk menginkubasi sampel



Mikroskop berfungsi untuk mengamati suatu objek secara mikroskopik dengan perbesaran tertentu.



Lemari Penyimpanan SDA berfungsi untuk menyimpan medium *Sabouraud Dextrose Agar* baru.



Kulkas Penyimpanan Ekstrak berfungsi untuk tempat menyimpan ekstrak.

2.2 Bahan Penelitian



Serbuk Biji Jintan Hitam digunakan sebagai bahan dasar ekstrak.



Proses Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)



Korek api dan Bunsen berfungsi untuk memanasi objek atau membakar objek tertentu.



Sabouraud Dextrose Agar berfungsi sebagai media pertumbuhan fungi.



Bahan *Staining* untuk pewarnaan gram terdiri dari *crystal violet*, lugol, alkohol 96%, safranin dan air. Rak *staining* digunakan sebagai tempat objek yang sedang diwarnai.



Imersi Oil berfungsi untuk memperjelas objek saat dilihat dibawah mikroskop.

LAMPIRAN III
UJI NORMALITAS DAN UJI HOMOGENITAS

3.1 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk Test*

Tests of Normality^b

	Konsentrasi Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Koloni	Konsentrasi Ekstrak 40%	,182	4	.	,975	4	,871
	Konsentrasi Ekstrak 45%	,215	4	.	,977	4	,886
	Konsentrasi Ekstrak 50%	,209	4	.	,961	4	,785
	Konsentrasi Ekstrak 55%	,336	4	.	,838	4	,189

a. Lilliefors Significance Correction

b. Jumlah Koloni is constant when Konsentrasi Ekstrak = Konsentrasi Ekstrak 60%. It has been omitted.

Keterangan: nilai signifikansi setiap konsentrasi ekstrak adalah sebesar 0,871; 0,886; 0,785; dan 0,189 yang artinya nilai $p > 0,05$ maka data berdistribusi normal.

3.2 Uji Homogenitas *Levene Homogeneity of Variance Test*

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,597	4	15	,079

Keterangan: nilai signifikansi sebesar 0,079 ($p > 0,05$) maka data bersifat homogen atau memiliki varian yang sama.

LAMPIRAN IV
ANALISIS STATISTIK *One Way ANOVA*

Descriptives								
Jumlah Koloni								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Konsentrasi Ekstrak 40%	4	2111,5000	13,72346	6,86173	2089,6629	2133,3371	2096,00	2127,00
Konsentrasi Ekstrak 45%	4	1109,0000	34,27341	17,13671	1054,4634	1163,5366	1072,00	1154,00
Konsentrasi Ekstrak 50%	4	639,5000	13,62596	6,81298	617,8181	661,1819	626,00	657,00
Konsentrasi Ekstrak 55%	4	75,2500	17,32772	8,66386	47,6777	102,8223	50,00	89,00
Konsentrasi Ekstrak 60%	4	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	20	787,0500	795,65719	177,91436	414,6710	1159,4290	,00	2127,00

ANOVA					
Jumlah Koloni					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12022790,200	4	3005697,550	8128,267	,000
Within Groups	5546,750	15	369,783		
Total	12028336,950	19			

Keterangan: nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap perubahan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni fungi yang tumbuh di media *Sabouraud Dextrose Agar*.

LAMPIRAN V

UJI LANJUT *Post Hoc Tukey*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Koloni

Tukey HSD

(I) Konsentrasi Ekstrak	(J) Konsentrasi Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi Ekstrak 40%	Konsentrasi Ekstrak 45%	1002,50000*	13,59749	,000	960,5120	1044,4880
	Konsentrasi Ekstrak 50%	1472,00000*	13,59749	,000	1430,0120	1513,9880
	Konsentrasi Ekstrak 55%	2036,25000*	13,59749	,000	1994,2620	2078,2380
	Konsentrasi Ekstrak 60%	2111,50000*	13,59749	,000	2069,5120	2153,4880
Konsentrasi Ekstrak 45%	Konsentrasi Ekstrak 40%	-1002,50000*	13,59749	,000	-1044,4880	-960,5120
	Konsentrasi Ekstrak 50%	469,50000*	13,59749	,000	427,5120	511,4880
	Konsentrasi Ekstrak 55%	1033,75000*	13,59749	,000	991,7620	1075,7380
	Konsentrasi Ekstrak 60%	1109,00000*	13,59749	,000	1067,0120	1150,9880
Konsentrasi Ekstrak 50%	Konsentrasi Ekstrak 40%	-1472,00000*	13,59749	,000	-1513,9880	-1430,0120
	Konsentrasi Ekstrak 45%	-469,50000*	13,59749	,000	-511,4880	-427,5120
	Konsentrasi Ekstrak 55%	564,25000*	13,59749	,000	522,2620	606,2380
	Konsentrasi Ekstrak 60%	639,50000*	13,59749	,000	597,5120	681,4880
Konsentrasi Ekstrak 55%	Konsentrasi Ekstrak 40%	-2036,25000*	13,59749	,000	-2078,2380	-1994,2620
	Konsentrasi Ekstrak 45%	-1033,75000*	13,59749	,000	-1075,7380	-991,7620
	Konsentrasi Ekstrak 50%	-564,25000*	13,59749	,000	-606,2380	-522,2620
	Konsentrasi Ekstrak 60%	75,25000*	13,59749	,000	33,2620	117,2380
Konsentrasi Ekstrak 60%	Konsentrasi Ekstrak 40%	-2111,50000*	13,59749	,000	-2153,4880	-2069,5120
	Konsentrasi Ekstrak 45%	-1109,00000*	13,59749	,000	-1150,9880	-1067,0120
	Konsentrasi Ekstrak 50%	-639,50000*	13,59749	,000	-681,4880	-597,5120
	Konsentrasi Ekstrak 55%	-75,25000*	13,59749	,000	-117,2380	-33,2620

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan: nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) maka dapat diketahui bahwa perbedaan rata-rata jumlah koloni fungi *Candida albicans* pada kelima konsentrasi ekstrak, yaitu 40%, 45%, 50%, 55% dan 60% adalah berbeda secara signifikan.

Homogeneous Subsets

Jumlah Koloni

Tukey HSD

Konsentrasi Ekstrak	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Konsentrasi Ekstrak 60%	4	,0000				
Konsentrasi Ekstrak 55%	4		75,2500			
Konsentrasi Ekstrak 50%	4			639,5000		
Konsentrasi Ekstrak 45%	4				1109,0000	
Konsentrasi Ekstrak 40%	4					2111,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Keterangan: rata-rata jumlah koloni fungi *Candida albicans* pada konsentrasi ekstrak 40%, 45%, 50%, 55% dan 60% adalah berbeda secara signifikan.

LAMPIRAN VI
UJI KORELASI DAN UJI REGRESI

6.1 Uji Korelasi *Pearson*

Correlations

		Jumlah Koloni Fungi	Konsentrasi Ekstrak
Jumlah Koloni Fungi	Pearson Correlation	1	-,959**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	20	20
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	-,959**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Keterangan: nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dan nilai *pearson correlation* (r) sebesar -0,959 artinya jumlah koloni fungi memiliki hubungan berkebalikan terhadap konsentrasi ekstrak pada derajat korelasi sangat kuat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin sedikit jumlah koloni fungi yang tumbuh.

6.2 Uji Regresi Linear Sederhana

a. *Variables Entered/Removed*

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Konsentrasi Ekstrak ^b		Enter

a. Dependent Variable: Jumlah Koloni Fungi

b. All requested variables entered.

b. Model Summary**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,959 ^a	,919	,914	232,73360

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi Ekstrak

c. ANOVA**ANOVA^a**

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	11053368,225	1	11053368,225	204,069	,000 ^b
1 Residual	974968,725	18	54164,929		
Total	12028336,950	19			

a. Dependent Variable: Jumlah Koloni Fungi

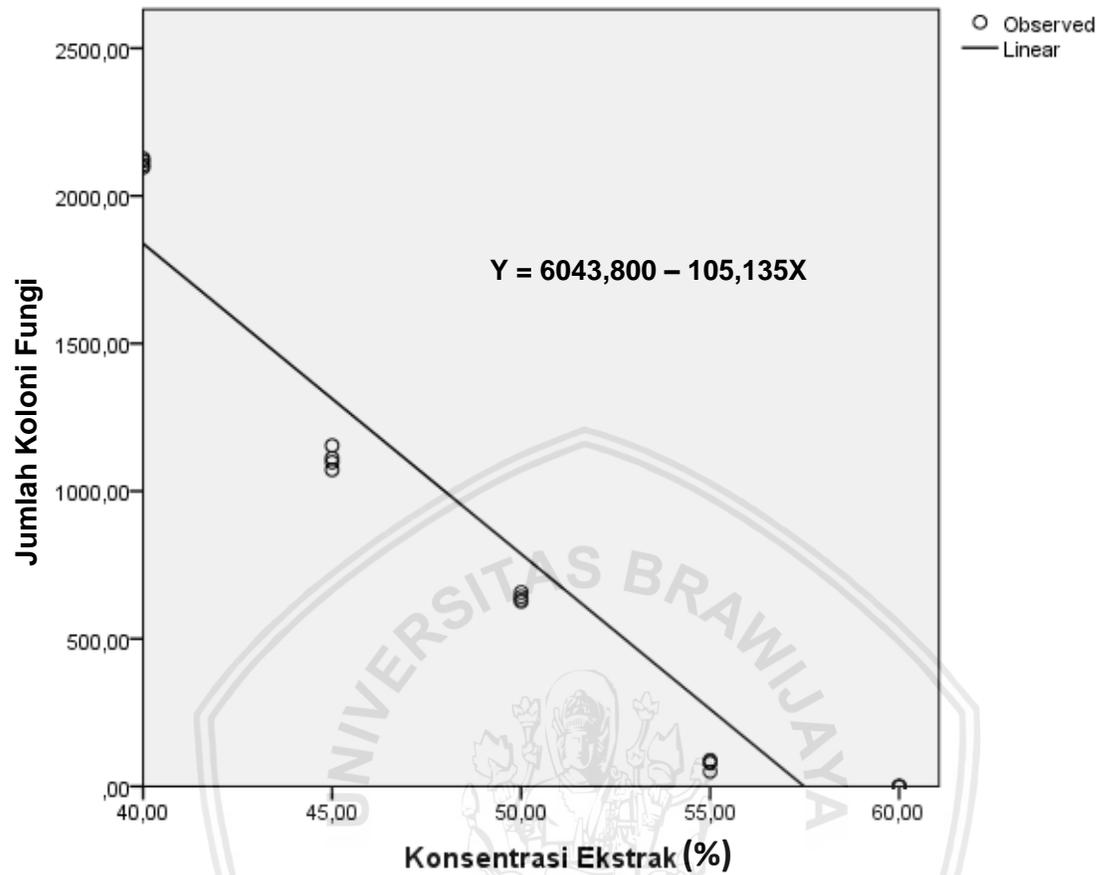
b. Predictors: (Constant), Konsentrasi Ekstrak

d. Coefficients**Coefficients^a**

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	6043,800	371,646		16,262	,000
1 Konsentrasi Ekstrak	-105,135	7,360	-,959	-14,285	,000

a. Dependent Variable: Jumlah Koloni Fungi

6.3 Grafik Persamaan Regresi Linear Sederhana



Keterangan: persamaan regresi linear grafik tersebut adalah $Y=6043,800 - 105,135X$. Nilai konsistensi jumlah koloni fungi adalah 6043,800. Setiap penambahan 1% nilai konsentrasi ekstrak, maka nilai jumlah koloni fungi akan berkurang sebesar 105,135. Berdasarkan persamaan ini, dapat diketahui bahwa tanpa pemberian ekstrak maka akan terjadi peningkatan jumlah koloni fungi sebanyak 6043,800.

LAMPIRAN VII

SURAT KETERANGAN EKSTRAK ETANOL BIJI JINTAN HITAM



POLITEKNIK NEGERI MALANG
JURUSAN TEKNIK KIMIA
UNIT PRODUKSI

Jl. Soekarno - Hatta No. 09 Telp (0341) 404420 - 404424 Malang, 65101
 Contact Person : Zulriadi (0341) 9158630 HP. 0813 3456 8567

No : 621 / UP-TK / EK / VII / 2019
 Perihal : Surat Keterangan
 Lampiran : 1 Lembar

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ir. Sri Rulianah, MTP
 NIP : 196302111988032001
 Jabatan : Ketua Unit produksi
 Jurusan Teknik Kimia
 Politeknik Negeri Malang

Dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Yogesvara
 Nim : 165070101111026
 Jurusan : Program Studi Kedokteran
 Instansi : Fakultas Kedokteran
 Universitas Brawijaya

Benar telah melakukan Ekstrak Biji Jintan Hitam dengan Metode Maserasi pada tanggal 22 - 26 April 2019 di Laboratorium Teknik Kimia, Jurusan Teknik Kimia - Politeknik Negeri Malang

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 19 Juli 2019
 Ketua Unit Produksi,



Ir. Sri Rulianah, M.TP
 NIP.196302111988032001

LAMPIRAN VIII

KUNCI DETERMINASI JINTAN HITAM


PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 222A/ 102.7/ 2019
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Jintan Hitam**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : YOGESVARA
 NIM : 165070101111026
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman jintan hitam
 Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Magnoliopsida (Berkeping dua/ dikotil)
 Sub Kelas : Magnoliidae
 Ordo : Ranunculales
 Famili : Ranunculaceae
 Genus : Nigella
 Spesies : *Nigella sativa* L.
 Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33b-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53a:15.Ranunculaceae, -1b-3b-5a: 2. Nigella.

2. Morfologi : Jinten hitam tumbuh berupa semak, semusim, dengan tinggi ± 30 cm. Batang nya tegak, lunak, beralur, hijau kemerahan. Daunnya tunggal, lonjong, ujung dan pangkal runcing, tepi beringgit, pertulangan menyirip, hijau. Bunganya berupa bunga majemuk, bentuk karang, benang sari banyak, tangkai sari dan kepala sari kuning, mahkota bentuk corong, dan berwarna putih kekuningan. Buahnya berupa polong, bulat panjang, coklat kehitaman, sedangkan bijinya kecil, bulat, dan hitam. Akar jintan hitam merupakan akar tunggang dan berwarna coklat.

3. Nama Simplisia : Nigellae sativae semen, melanthii semen/ biji jintan hitam

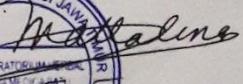
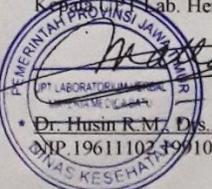
4. Kandungan : Minyak atsiri, melantin (saponin), nigelin (zat pahit), nigelon, timokinon, minyak lemak, dan zat samak. Biji dan daun mengandung saponin dan polifenol.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/jintanhitam>, diakses tanggal 30 Oktober 2010.
- Backer, C.A. & Bakhuizen Van Den Brink, R.C. 1963. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol I. N.V.P. Noordhoff, Groningen.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 25 Maret 2019
 Kepala Lab. Herbal Materia Medica Batu


 • Dr. Husin R.M. Dis., Apt., M.Kes.
 NIP. 196111023199103 1 003