



“Tema: 3 (pangan, gizi dan kesehatan)”

PENGARUH EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP TNF- α MENCIT Balb-c YANG DIINFEKSI MRSA

Oleh

Galuh Yulietta Nitihapsari¹, Octavia Permata Sari², Miko Ferine³

¹Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman

²Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman

³Departemen Bioetik, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman

¹galuh.nitihapsari@unsoed.ac.id, ²octavia.sari@unsoed.ac.id, ³mikoferine@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Meningkatnya fenomena resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik salah satu contohnya MRSA (Metisilin Resisten *Staphylococcus aureus*) menjadi masalah yang serius. MRSA dapat menyebabkan penyakit meningitis, impetigo, abses, dan sepsis yang mengancam nyawa. Hal ini mendorong pentingnya pencarian herbal yang memiliki efek anti bakterial melalui modulasi sistem imun. Respons imun diaktifkan saat terjadi invasi bakteri, yaitu ketika peptidoglikan *S. aureus* sebagai antigen masuk ke dalam tubuh akan menstimulasi fagositosis oleh makrofag dan produksi sitokin IL-1, IL-6, dan TNF α yang akan mengawali proses migrasi leukosit menuju jaringan untuk mengeliminasi bakteri. *Nigella sativa* (NS) diketahui memiliki efek antimikroba MRSA tetapi belum pernah diteliti sitokin yang berperan, sehingga diharapkan pada penelitian ini dapat lebih mengetahui peran *Nigella sativa* dalam mengatasi infeksi MRSA melalui peningkatan sitokin TNF- α . **Tujuan:** Membuktikan efek ekstrak *Nigella sativa* terhadap TNF- α . **Metode:** Desain penelitian ini adalah “Post test only control group design”. Populasi studi menggunakan 25 ekor mencit balb-c jantan yang diinfeksi MRSA dan dibagi secara acak dalam lima kelompok yaitu kelompok K (mencit diinfeksi MRSA tanpa diterapi), P1 (mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,05 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA), P2 (mencit diterapi ekstrak NS 0,25 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA), P3 (mencit diterapi ekstrak NS 0,5 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA), dan P4 (mencit diterapi ekstrak NS 0,75 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA). TNF- α dinilai dengan ELISA. Uji statistik menggunakan uji One Way Anova dilanjutkan uji Post Hoc LSD. **Hasil:** Hasil rerata kadar TNF- α pada kelompok K = $38,01 \pm 2,68$; P1 = $35,44 \pm 3,52$; P2 = $39,11 \pm 7,10$; P3 = $39,47 \pm 3,17$; dan P4 = $47,29 \pm 3,17$. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K-P4 ($p=0,011$), P1-P4 ($p=0,001$), P2-P4 ($p=0,018$), dan P3-P4 ($p=0,031$). **Kesimpulan:** Ekstrak *Nigella sativa* seiring dengan pertambahan dosis terbukti efektif dalam meningkatkan kadar TNF- α mencit balb-c yang diinfeksi MRSA

Kata kunci: *Nigella sativa*, TNF- α , MRSA

ABSTRACT

Background: The increasing phenomenon of bacterial resistance to various types of antibiotics, for example MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) is a serious problem. MRSA can cause meningitis, impetigo, abscesses, and sepsis that are life threatening. This encourages the importance of finding herbs that have anti-bacterial effects through immune system modulation. The immune response is activated when there is a bacterial invasion, when peptidoglycan of *S.aureus* as an



antigen enters the body will stimulate phagocytosis by macrophages and the production of cytokines IL-1, IL-6, and TNF α which will initiate the migration of leukocytes into the tissues to eliminate bacteria. *Nigella sativa* (NS) is known to have an antimicrobial effect of MRSA but the role of cytokines have never been studied, so it is hoped that in this study the role of *Nigella sativa* in overcoming MRSA infections through increased cytokine TNF- α can be known. **Objective:** To prove the effect of *Nigella sativa* extract on TNF- α . **Method:** The design of this study was "Post test only control group design". The study population used 25 male balb-c mice infected with MRSA and were randomly divided into five groups namely group K (mice infected with MRSA without being treated), P1 (mice treated with 0.05 ml *Nigella sativa* extract for 7 days then infected with MRSA), P2 (mice treated with 0.25 ml NS extract for 7 days then infected with MRSA), P3 (mice treated with 0.5 ml NS extract for 7 days then infected with MRSA), and P4 (mice treated with 0.75 ml NS extract for 7 days then infected MRSA). TNF- α was assessed by ELISA. Statistical tests used the One Way Anova test followed by the Post Hoc LSD test. **Results:** Mean TNF- α levels in group K = 38.01 ± 2.68 ; P1 = 35.44 ± 3.52 ; P2 = 39.11 ± 7.10 ; P3 = 39.47 ± 3.17 ; and P4 = 47.29 ± 3.17 . There were significant differences between the K-P4 groups ($p = 0.011$), P1-P4 ($p = 0.001$), P2-P4 ($p = 0.018$), and P3-P4 ($p = 0.031$). **Conclusion:** *Nigella sativa* extract along with increasing dosage proved effective in increasing TNF- α levels of balb-c mice infected by MRSA

Key words: *Nigella sativa*, TNF- α , MRSA

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Staphylococcus aureus sebagai salah satu patogen umum penyebab sepsis memiliki kemampuan menghasilkan sejumlah faktor virulensi yang penting pada patogenesis infeksi. Salah satunya yaitu kemunculan bakteri sebagai multi drug resistant (MDR) seperti *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang dapat meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas. MRSA (Metisilin Resisten *Staphylococcus aureus*) dikenal sebagai salah satu bakteri penyebab utama infeksi nosokomial di berbagai rumah sakit di seluruh dunia sejak era 1980-an dengan prevalensi rata-rata 50% (Yuwono 2010).

Resistensi MRSA terjadi karena MRSA memiliki gen *mecA* yang menyandi protein mutan penicillin-binding protein 2a (PBP2a atau PBP2'). Ekspresi resistensi gen *mecA* dikendalikan oleh gen regulator *mecI* dan *mecR1* yang homolog dan memiliki mekanisme kerja yang serupa dengan regulator pada gen penyandi penisilinase (Al-Ruaily and Khalil 2011).

Sistem pertahanan tubuh atau respons imun diaktifkan dengan adanya invasi bakteri *S. aureus*, yaitu ketika *S. aureus* sebagai antigen masuk ke dalam tubuh akan menstimulasi fagositosis oleh makrofag karena perannya dalam sistem imun alami. Makrofag, sel dendritik, dan sel lain mengenali mikroba dan memberi respon dengan memproduksi sitokin. Dua dari sitokin-sitokin ini yaitu TNF dan IL-1 bekerja pada endotel venula pada lokasi infeksi dan mengawali proses migrasi leukosit menuju jaringan yang akhirnya akan mengeliminasi bakteri (Abbas et al. 2016; Abousouh et al. 2017).



Antibiotik hanya membunuh atau menghambat bakteri yang peka. Hal ini menyebabkan seleksi strain yang resisten hingga akhirnya penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif. Saat ini meluasnya resistensi bakteri terhadap obat-obatan yang ada, mendorong pentingnya penggalian sumber bahan alam yang memiliki sifat antibakteri melalui modulasi respon imun (Mufidah et al. 2013).

Selama berabad-abad biji jintan hitam telah digunakan sebagai obat herbal untuk meningkatkan kesehatan dan melawan penyakit terutama di Timur Tengah dan Asia Tenggara (Gilani et al. 2004). Minyak *Nigella sativa*, yang mengandung timokuinon (TQ) dan timohidrokuinon (THQ), mempunyai efek inhibisi terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Ismaeil 2011). Jintan hitam dikenal sebagai salah satu herbal dalam pengobatan nabati. Beberapa penelitian telah dilakukan mengenai efek immunomodulator dari ekstrak etanol jintan hitam, salah satunya penelitian yang dilakukan Suhatri dimana pemberian ekstrak etanol jintan hitam dengan dosis bertingkat 50mg/kgbb, 100mg/kgbb, dan 200 mg/kgbb pada mencit yang diberikan antigen suspensi eritrosit kambing 5% dapat meningkatkan jumlah limfosit, monosit, serta menurunkan jumlah neutrofil segmen yang signifikan (Aldi and Suhatri 2011). Khasiat anti mikroba dari tanaman jintan hitam sebagian besar didasarkan percobaan in vitro dan beberapa telah dilakukan secara in vivo tetapi tidak diteliti sitokin dan respon imun yang berperan. Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ekstrak *Nigella sativa* terhadap sitokin TNF- α yang memainkan peranan penting dalam perekrutan leukosit ke tempat infeksi dan fagositosis makrofag untuk menurunkan jumlah kuman MRSA secara in vivo. Eksplorasi respon imun tubuh terhadap infeksi MRSA dapat dijadikan dasar pencarian strategi untuk mengatasi masalah resistensi antibiotik. Hal tersebut akan membantu dalam penyusunan strategi terapi dalam mengatasi infeksi MRSA.

Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu diungkap apakah ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dapat meningkatkan TNF- α pada mencit balb-c yang diinfeksi MRSA?

Tujuan Penelitian

Tujuan umum

Menilai potensi ekstrak *Nigella sativa* terhadap TNF- α pada mencit balb-c yang diinfeksi MRSA.

Tujuan khusus

1. Mengukur kadar TNF- α pada mencit balb-c yang diinfeksi MRSA dan diterapi *Nigella sativa* dengan dosis 50mg/kgbb/hari atau 0,05ml, 250mg/kgbb/hari atau 0,25ml, 500 mg/kgbb/hari atau 0,5ml, dan 750 mg/kgbb/hari atau 0,75ml.
2. Mengukur kadar TNF- α pada mencit balb-c yang diinfeksi MRSA dan tidak diterapi *Nigella sativa*



METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 8 bulan. Biji Jintan Hitam didapatkan dari toko jamu Ting Bao di Purwokerto. Pembuatan ekstrak *Nigella sativa* dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman. Perlakuan pada mencit dan proses pengambilan darah dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Bakteri uji MRSA ATCC 43300 didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Pemeriksaan kadar TNF- α menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA) dilakukan di Lab. Riset Fakultas Kedokteran Unsoed Purwokerto.

Bahan dan Alat

Hewan coba adalah mencit jantan strain balb-c dengan umur 8 minggu, dan berat 20-30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara ad libitum. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu. Biji jintan hitam dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dan vakum evaporator dengan pelarut etanol 96 % dan hasilnya diencerkan dengan CMC sampai tercapai konsentrasi 20mg/ml. Bakteri MRSA didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Dilakukan inokulasi dengan cara mengembangbiakkan pada medium *nutrient broth* (NB) cair dan diinkubasi selama 1x24 jam. Diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan 9 ml medium NB baru. Dilakukan proses penghitungan bakteri dengan menggunakan haemocytometer setiap satu jam sampai mendapatkan konsentrasi sel bakteri 10^7 sel/ml, kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Pellet yang diperoleh selanjutnya disuspensi dengan 1 ml PBS. Suspensi tersebut selanjutnya diberikan secara injeksi intraperitoneal pada hewan coba. Pemeriksaan kadar TNF- α menggunakan Bioassay Technology Laboratory Mouse TNF- α ELISA Kit dilakukan di Lab. Riset Fakultas Kedokteran Unsoed Purwokerto.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain "*Post test only control group design*". Subyek penelitian adalah 25 ekor mencit Balb-c jantan yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang diinfeksi MRSA *American Type Culture Collection* (ATCC) 43300 0,2 ml (10^7 cfu/ml) melalui injeksi intraperitoneal. Kelompok penelitian dibagi menjadi 5 yaitu kelompok kontrol (K) yaitu mencit yang diinfeksi tetapi tidak diterapi, perlakuan 1 (P1) yaitu mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,05 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA, perlakuan 2 (P2) yaitu mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,25 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA, perlakuan 3



(P3) yaitu mencit yang diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,5 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA dan perlakuan 4 (P4) yaitu mencit yang diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,75 ml selama 7 hari kemudian diinfeksi MRSA. Kriteria inklusi pada penelitian ini meliputi tikus jantan umur 2 bulan, strain Balb-c yang diinfeksi MRSA, berat badan $\pm 20 - 30$ gram setelah aklimatisasi selama seminggu di kandang individual, dan tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah jika mencit tampak sakit sebelum diinfeksi bakteri MRSA, sedangkan kriteria *drop-out* adalah jika selama induksi dan perlakuan, tikus mati.

Variabel bebas adalah dosis ekstrak *Nigella sativa*. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar TNF- α . Mencit diterminasi 24 jam setelah injeksi MRSA secara intraperitoneal pada mencit untuk diambil sampel darahnya untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dengan metode ELISA.

Analisis Data

Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif kadar TNF- α disajikan dalam bentuk tabel rerata dan SD. Kemudian dilakukan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk*.

Pada data kadar TNF- α uji hipotesis yang digunakan adalah uji *One Way Anova* dengan alternatif uji Non Parametrik *Kruskal Wallis*, dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test LSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* pada kadar TNF- α mencit balb-c yang diinfeksi MRSA. Dua puluh lima ekor mencit Balb-c diadaptasi selama 7 hari dan tidak didapatkan tikus sakit ataupun mati, kemudian dilakukan randomisasi ke dalam 5 kelompok. Dua puluh empat jam setelah diinfeksi MRSA, mencit diambil darahnya kemudian diterminasi.

Tabel 1 menunjukkan bahwa dengan penambahan dosis *Nigella sativa* dapat dilihat peningkatan kadar TNF- α yang bermakna secara statistik ($p=0,017$). Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *Nigella sativa* dapat meningkatkan sitokin pro inflamasi TNF- α untuk eliminasi kuman MRSA. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Suhatri dimana pemberian ekstrak etanol jintan hitam dengan dosis bertingkat 50mg/kgbb, 100mg/kgbb, dan 200 mg/kgbb pada mencit yang diberikan antigen suspensi eritrosit kambing 5% dapat meningkatkan jumlah limfosit, monosit, serta menurunkan jumlah neutrofil segmen yang signifikan. (Aldi and Suhatri 2011).

Tabel 1. Hasil uji one way annova kadar TNF- α

Perlakuan	N	Mean \pm SD	p-value
K	5	38,01 \pm 2,68	0,017
P1	5	35,44 \pm 3,52	



P2	5	39,11 ± 7,10
P3	5	39,47 ± 3,17
P4	5	47,29 ± 3,17

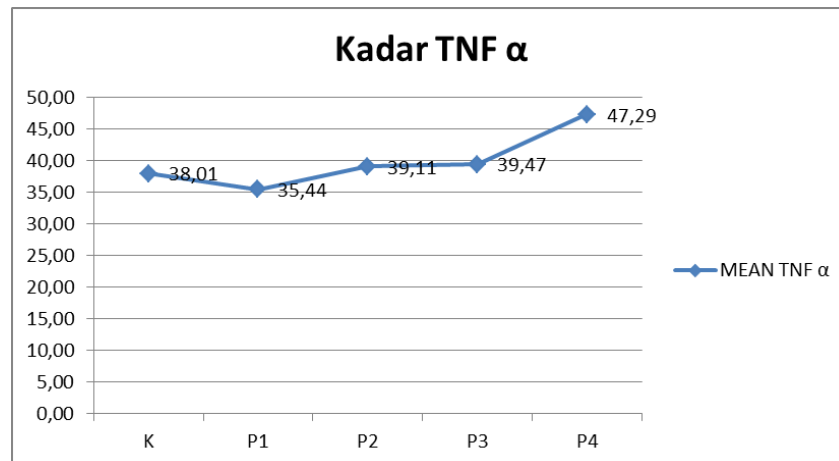
Keterangan:

- K = Mencit diinfeksi MRSA dan tidak diterapi
- P1 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,05 ml selama 7 hari dan diinfeksi MRSA
- P2 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,25 ml dan diinfeksi MRSA
- P3 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,5 ml dan diinfeksi MRSA
- P4 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,75 ml dan diinfeksi MRSA

Seiring dengan pertambahan dosis *Nigella sativa*, rerata kadar TNF- α pada mencit yang diinfeksi MRSA juga bertambah. Walaupun demikian pada P1 ditemukan rerata kadar TNF- α lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dimungkinkan karena beberapa faktor antara lain dosis *Nigella sativa* yang masih terlalu kecil sehingga belum mampu meningkatkan TNF- α dan sifat anti bakteri dari ekstrak *Nigella sativa* itu sendiri. *Nigella sativa* menurut penelitian terdahulu diketahui mampu menurunkan jumlah kuman MRSA baik secara in vitro (Ugur et al. 2016) dan in vivo (Marga et al. 2015).

Menurut penelitian Ozair, semakin bertambahnya dosis *Nigella sativa* menghasilkan zona hambat yang semakin besar terhadap kuman MRSA secara in vitro (Ozair et al. 2018). Ini menjelaskan mengapa rerata kadar TNF- α pada kelompok yang hanya mendapatkan ekstrak *Nigella sativa* 0,05 ml lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dimungkinkan karena dosis ekstrak yang masih terlalu kecil sehingga belum mampu mengatasi infeksi MRSA secara invitro melalui peningkatan sitokin TNF- α . Meskipun demikian, dari gambar 1 dapat dilihat kecenderungan peningkatan kadar TNF- α seiring dengan pertambahan dosis *Nigella sativa*. Kesan yang didapatkan dari penelitian ini bahwa *Nigella sativa* meningkatkan respon pro inflamasi sebagai proses dalam mengatasi infeksi MRSA.

Hasil dari uji one way Annova didapatkan nilai p= 0,017 sehingga dilanjutkan dengan uji post hoc LSD dan didapatkan hasil terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K-P4 (p=0,011), P1-P4 (p=0,001), P2-P4 (p=0,018), dan P3-P4 (p=0,031)



Keterangan:

- K = Mencit diinfeksi MRSA dan tidak diterapi
- P1 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,05 ml selama 7 hari dan diinfeksi MRSA
- P2 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,25 ml dan diinfeksi MRSA
- P3 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,5 ml dan diinfeksi MRSA
- P4 = mencit diterapi ekstrak *Nigella sativa* 0,75 ml dan diinfeksi MRSA

Gambar 1. Rerata kadar TNF- α

KESIMPULAN

Ekstrak *Nigella sativa* seiring dengan penambahan dosis terbukti efektif dalam meningkatkan kadar TNF- α mencit balb-c yang diinfeksi MRSA.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman A.H. and Pillai S. 2016. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 5 Edition. W.B Saunders Company. Philadelphia.
- Abousouh, Said, Edi Widjajanto and Hidayat Sujuti. 2017. Effect of Thymus vulgaris Extract on Level of Serum, Il12 and Bacterial Colonies in Liver in Mice Infected by Salmonella Typhimurium. *International Journal of ChemTech Research* 10(9): 881 – 886
- Al-Ruaily, Meshref Awad and Omer Mohamed Khalil. 2011. Detection of (mecA)gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) at Prince A / Rhman Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. *Journal of Medical Genetics and Genomics* 3(3): 41 – 45
- Aldi, Yufri and Suhatri. 2011. Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* Linn. Terhadap Titer Antibodi Dan Jumlah Sel Leukosit Pada Mencit Putih Jantan. *Scientia Journal of Pharmaceutical and Health* 1(1): 35 – 41
- Gilani, Anwar-ul Hassan, qaiseer Jabeen and Muhammad Asad Ullah Khan. 2004. A Review of Medicinal Uses and Pharmacological Activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(4): 441 – 451



- Ismaeil, Abdulilah S. 2011. Effect of Black Seed Alkaloids Against some Pathogenic Bacteria. *Rafidain Journal of Science* 22(7): 9 – 16
- Marga, Bernadetta Via, Edi Dharmana and Purnomo Hadi. 2015. Pengaruh Pemberian Minyak Nigella sativa Dan Kombinasinya Dengan Seftriakson Terhadap Jumlah Kuman Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Pada Kultur Otak Mencit Balb/c. *Media Medika Muda* 4(4): 522 – 530
- Mufidah, Z, Muhaimin R and Rahayu S. 2013. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Buah Mengkudu pada Mencit yang Diinfeksi Staphylococcus aureus. *Jurnal Veteriner* 14(4): 501 – 510
- Ozair, Asma B., Musa Abdullah Ali, Marwa M. Ahmed, Khlood M. Ahmed and Razan H. Mudathir. 2018. In vitro Antibacterial activity of Nigella Sativa extract against clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)* 6(6): 2111 – 2113
- Ugur, A. R., H. T. Dagi, B. Ozturk, G. Tekin and D. Findik. 2016. Assessment of In vitro Antibacterial Activity and Cytotoxicity Effect of Nigella sativa Oil. *Pharmacogn Mag* 12(Suppl 4): S471 – S474
- Yuwono. 2010. Pandemi Resistensi Antimikroba: Belajar dari MRSA. *J. of Kulit Kelamin* 42(1): 2837 – 2850