

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP BAKTERI *Shigella sonnei* DAN *Bacillus cereus* SERTA BIOAUTOGRAFINYA

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACT AND FRACTION OF BLACK CUMIN (*Nigella sativa*) AGAINST *Shigella sonnei* AND *Bacillus cereus* BACTERIA AND THEIR BIOAUTOGRAPHY

Fera Astika¹, Cita Hanif Muflihah^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl A. Yani, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail: chm641@ums.ac.id

Abstrak

Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Jintan hitam memiliki kandungan senyawa kimia seperti *thymoquinone*, *dithymquinone*, *thymohydroquinone* dan *thymol*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi jintan hitam terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode difusi disk (*Kirby Bauer*) digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi ekstrak sebesar 2, 4, 6 dan 8 mg/disk, sedangkan konsentrasi fraksi yang digunakan adalah 2, 4, dan 6 mg/disk. Hasil uji menunjukkan bahwa diameter zona hambat karena perlakuan dengan ekstrak jintan hitam terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* pada konsentrasi 6 mg/disk berturut-turut sebesar 18,6 dan 18,5 mm, sedangkan fraksi etil asetat jintan hitam dengan konsentrasi 6 mg/disk terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* berturut-turut sebesar 10,0 dan 9,7 mm. Hasil uji bioautografi menunjukkan kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada fraksi etil asetat yaitu alkaloid.

Kata Kunci: antibakteri, *Nigella sativa*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, Bioautografi

Abstract

Black cumin seeds (*Nigella sativa*) have been used for a long time as a traditional medicine to cure various diseases. Black cumin contains chemical compounds such as *thymoquinone*, *dithymquinone*, *thymohydroquinone* and *thymol*. The purpose of this study was to determine the bacterial activity of extract and fractions of black cumin against *Shigella sonnei* and *Bacillus cereus*. Extraction was done using maceration method with ethanolic 96%. Disc diffusion method (*Kirby Bauer*) was performed to measure the antibacterial activity on various concentrations of the extract at 2, 4, 6 and 8 mg/disk, while the concentration of fraction were at 2, 4, and 6 mg/disk. The results showed that the inhibition zones due to the treatment with black cumin extract against *Shigella sonnei* and *Bacillus cereus* at the concentrations of 6 mg/disk were 18.6 and 18.5 mm respectively, while the ethyl acetate fraction of black cumin extract at the concentration of 6 mg/disk resulted in a inhibition zone of 10.0 and 9.7 mm against *Shigella sonnei* and *Bacillus cereus* respectively. The results of the bioautography showed that the active compound contained in the extract belongs to the alkaloid groups.

Keywords: antibacterial, *Nigella sativa*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, Bioautography

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh masuk dan berkembang biaknya mikroorganisme mikroskopik dalam tubuh salah satunya adalah bakteri (Novard *et al.*, 2019). Beberapa bakteri penyebab infeksi adalah *Bacillus cereus* dan *Shigella sonnei*. Bakteri *Bacillus cereus* dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat, lipid, dan protein yang menyebabkan kerusakan pangan dan keracunan (Sopandi and Wardah, 2014). Terdapat sebanyak 175 laporan KLB di Indonesia antara tahun 2000-2015, 19,4% diantaranya disebabkan oleh *Bacillus cereus* (Arisanti *et al.*, 2018). *Shigella* merupakan penyebab utama disentri di seluruh dunia. Pada tahun 1995-2001, dilaporkan telah berhasil diisolasi 2.812 bakteri penyebab diare, 15% diantaranya adalah *Shigella sonnei*. Bakteri *Shigella sonnei* dilaporkan resisten terhadap antibiotik streptomisin, sulfonamid, tetrasiklin, ampisilin dan trimetoprim (Yenny dan Herwana, 2007).

Biji jintan hitam telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Jintan hitam (*Nigella sativa*) termasuk dalam famili *Ranunculaceae* yang merupakan tumbuhan asli negara-negara Mediterania yang sudah diekspor ke berbagai negara di belahan dunia. Ekstrak tumbuhan Jintan Hitam (*Nigella sativa*) sudah terbukti memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang cukup kuat (Hidayat *et al.*, 2022). Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) memiliki kandungan senyawa kimia seperti *thymoquinone*, *dithymoquinone*, *thymohydroquinone* dan *thymol* (Mohammad *et al.*, 2009). Selain itu, ekstrak etanol dari jintan hitam juga terbukti mengandung senyawa alkaloid, saponin dan steroid (Marlinda, 2015).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak etanol biji jintan hitam dengan konsentrasi 2,5 mg/disk menghasilkan zona hambat sebesar $1,328 \pm 0,028$ cm terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan $1,187 \pm 0,103$ cm terhadap bakteri *Escherichia coli* (Agustinasari *et al.*, 2016). Penelitian terdahulu membuktikan bahwa jintan hitam mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 10, 7,5, dan 50 mg/disk. Pada penelitian yang dilakukan oleh Wadud (2014), ekstrak *Nigella sativa* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* pada konsentrasi 0,175 mg/disk dengan zona hambat yang terbentuk sebesar 35,66 mm. Jintan hitam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri, antara lain: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus* (Agustinasari *et al.*, 2016).

Pada penelitian sebelumnya, telah terbukti bahwa ekstrak jintan hitam dapat menghambat pertumbuhan bakteri antara lain bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri dari fraksi jintan hitam. Fraksinasi merupakan pemisahan senyawa berdasarkan dengan tingkat kepolarannya dalam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda pula. Maka dari itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi jintan hitam yang dilakukan terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* (Papatungan *et al.*, 2019).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, bejana maserasi, corong kaca, batang pengaduk, *rotary evaporator*, *waterbath*, lemari pendingin, rak tabung reaksi, tabung reaksi, sendok tanduk, mikropipet, cawan petri, *spreader glass*, jarum ose bulat, standar Mc Farland 0,5 CFU ($1,5 \times 10^8$), pinset, inkubator, gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, Laminar

Air Flow (LAF), *Shaker incubator*, Lampu UV 254 nm dan 366 nm, oven, autoklaf, *magnetic stirrer*, cawan porselin.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jintan hitam (*Nigella sativa*), etanol 96%, alkohol 70% bakteri *Shigella sonnei*, bakteri *Bacillus cereus*, kertas saring, alumunium foil, aquadest, media Nutrient Agar (NA), media *Brain Heart Infussion* (BHI), Dimetil Sulfoksida 5% (DMSO 5%), NaCl, *yellow tips*, *blue tips*, disk kosong, disk kloramfenikol 30µg, disk ampisilin 10µg, disk eritromisin 15µg, spiritus, plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silica G60 F254, pipa kapiler, N-heksan, etil asetat, metanol, sikloheksana, diklorometana, pereaksi Dragendorff, pereaksi sitroborat, pereaksi FeCl₃ 5%.

Penyiapan bahan dan ekstraksi

Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) didapatkan dari toko obat tradisional di Kota Madiun. Biji jintan hitam yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk jintan hitam ditimbang sebanyak 1000 g kemudian direndam dengan 5L etanol 96% selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Sari yang terbentuk disaring menggunakan penyaring teh dan disaring kembali menggunakan kertas saring kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C. Ekstrak etanol yang dihasilkan kemudian diuapkan kembali dengan *waterbath* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental (Wendersteyt *et al.*, 2021)

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan 3 pelarut, yaitu n-heksan, etil asetat, dan air. Langkah pertama yang dilakukan yaitu sebanyak 10 gram ekstrak jintan hitam dilarutkan dalam 50 mL air dan dimasukkan ke dalam corong pisah. N-heksan sebanyak 50 mL ditambahkan ke dalam corong pisah yang telah berisi campuran ekstrak dan air kemudian digojog selama kurang lebih 5 menit sambil menutup dan membuka kran, setelah itu campuran didiamkan hingga memisah. Fase bawah dan fase atas ditempatkan ditempat yang berbeda. Setelah itu fase bawah (air) dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan ditambahkan lagi 50 mL n-heksan dan dilakukan hal yang sama sebanyak 3 kali. Lapisan air dimasukkan lagi ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan etil asetat sebanyak 50 mL dan dilakukan 3 kali pengulangan seperti perlakuan diatas. Hasil dari fraksinasi tersebut kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C dan diuapkan kembali dengan *waterbath* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental (Paputungan *et al.*, 2019).

Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, *beaker glass*, dan alat gelas lainnya dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan hingga tidak terdapat sisa air. Alat-alat gelas yang telah kering dibungkus dengan kertas dan disterilisasi menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Alat-alat yang tidak tahan terhadap pemanasan kering tetapi tahan terhadap tekanan seperti media Nutrient Agar (NA), media *Brain Heart Infussion* (BHI), *blue tips*, *yellow tips*, dan lainnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Ose, *spreader glass* dan pinset disterilkan dengan cara dibakar (Azizah *et al.*, 2019)

Pembuatan Media

Media Nutrient Agar (NA)

Media NA dalam bentuk serbuk ditimbang sebanyak 2,8 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Kemudian diletakkan di atas magnetic stirrer selama 15 menit, setelah itu disterilisasi

menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang ke dalam cawan petri steril dan didiamkan pada suhu ruang selama beberapa menit hingga media memadat.

Media Brain Heart Infusion (BHI)

Media BHI dalam bentuk serbuk ditimbang sebanyak 3,7 g dan dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Kemudian diletakkan di atas magnetic stirer selama 15 menit, setelah itu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang ke dalam tabung reaksi sesuai kebutuhan.

Peremajaan Bakteri

Cawan petri berisi media Nutrient Agar (NA) yang telah memadat diberi tanda menjadi 4 kuadran di bagian bawah cawan. Biakan bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* diambil masing-masing 1 ose lalu ditanam pada permukaan media Nutrient Agar (NA) dengan metode streak plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Wijayati *et al.*, 2014).

Pembuatan suspensi bakteri

Suspensi Brain Heart Infusion (BHI)

Biakan bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* pada plate media Nutrient Agar (NA) masing-masing diambil sebanyak 3-5 koloni dan disuspensikan pada BHI cair sebanyak 5 mL. Suspensi tersebut diletakkan dalam *shaker* inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Suspensi Natrium Klorida (NaCl) 0,9%

Pada pembuatan suspensi Natrium Klorida (NaCl) 0,9%, suspensi bakteri pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) diambil sebanyak 100 µL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Konsentrasi bakteri disamakan dengan standar 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) dengan cara menambahkan NaCl steril hingga diperoleh suspensi dengan tingkat kekeruhan yang sama dengan standar (Kurniawan *et al.*, 2019).

Pembuatan seri konsentrasi

Ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) dibuat dalam seri konsentrasi 20, 40, 60 dan 80%. Sementara itu, untuk fraksi dibuat dalam seri konsentrasi 20, 40, dan 60%. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak dan fraksi jintan hitam terbukti menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang paling baik pada konsentrasi ekstrak 25%, sehingga penelitian ini akan diuji menggunakan konsentrasi 20, 40, 60 dan 80% pada ekstrak serta 20, 40, dan 60% pada fraksi (Agustianasari *et al.*, 2016). Pembuatan konsentrasi dengan cara mengambil ekstrak dengan berat masing-masing sebesar 200, 400, 600 dan 800 mg, sementara untuk fraksi diambil masing-masing sebesar 200, 400, dan 600 mg kemudian diencerkan menggunakan Dimetil Sulfoksida 5% (DMSO 5%) hingga 1 mL. Berdasarkan konsentrasi ekstrak 20, 40, 60, 80% dan volume ekstrak 10 µL/disk maka loading ekstrak dalam disk berturut-turut sebesar 2, 4, 6 dan 8 mg/disk. Sementara itu untuk fraksi dengan konsentrasi 20, 40, dan 60%, *loading* ekstrak dalam disk berturut-turut sebesar 2, 4, dan 6 mg/disk.

Uji sensitivitas terhadap antibiotik

Antibiotik yang digunakan dalam uji sensitivitas ini yaitu kloramfenikol 30 µg, ampicilin 10 µg dan eritromisin 15 µg. Bakteri yang telah disetarakan kekeruhannya dengan standar 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) diambil sebanyak 200 µL. Bakteri tersebut diletakkan di media Nutrient Agar (NA) pada cawan petri kemudian diratakan menggunakan *spreader glass* dan dibiarkan hingga permukaannya kering. Setelah permukaan kering, masing-masing disk kloramfenikol 30µg, ampicilin 10µg dan eritromisin 15µg diletakkan di permukaan media yang telah berisi suspensi bakteri dengan memberi jarak antara masing-masing disk antibiotik. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati dan diukur diameter zona

hambatnya. Antibiotik yang memiliki zona hambat paling besar digunakan sebagai kontrol positif dalam uji aktivitas antibakteri (Hayati *et al.*, 2012). Metode yang digunakan untuk uji antibakteri yaitu metode Kirby Bauer yang dipilih karena memiliki prosedur yang sederhana dan mudah dilakukan. Suspensi bakteri yang telah disesuaikan kekeruhannya dengan standar 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) diambil dengan mikropipet sebanyak 200 μ L kemudian diletakkan dipermukaan media Nutrient Agar (NA) dan diratakan menggunakan *spreader glass* serta ditunggu sekitar 15 menit. Konsentrasi ekstrak jintan hitam yang akan diujikan yaitu 2, 4, 6 dan 8 mg/disk, sedangkan konsentrasi fraksi yang akan diujikan yaitu 2, 4 dan 6 mg/disk. Untuk kontrol positif digunakan disk yang sudah berisi antibiotik kloramfenikol 30 μ g dan eritromisin 15 μ g, serta untuk kontrol negatif digunakan Dimetil Sulfoksida 5% (DMSO 5%). Ekstrak dan fraksi dengan berbagai konsentrasi diambil sebanyak masing-masing 10 μ L kemudian diteteskan pada disk kosong dan ditunggu hingga mengering. Setelah kering, masing-masing disk diletakkan pada media Nutrient Agar (NA) yang sudah terisi suspensi bakteri dengan 1 cawan berisi kontrol negatif, kontrol positif dan konsentrasi ekstrak. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian diamati hasilnya. Zona hambat ditandai dengan terbentuknya daerah bening di sekitar disk, semakin besar diameter zona hambat maka semakin kuat kemampuan senyawa untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Merta *et al.*, 2013).

Analisis Kualitatif KLT

Sampel yang digunakan untuk uji kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu ekstrak dan fraksi yang memiliki zona hambat paling besar. Ekstrak dengan konsentrasi 80% dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 60% masing-masing ditotolkan pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silica G60 F254 sebanyak 2 μ L menggunakan pipa kapiler dan dilusi menggunakan fase gerak metanol : sikloheksan : diklorometana (60:20:74) v/v/v. Plat diangin-anginkan hingga kering kemudian diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm, selanjutnya plat disemprot dengan reagen Dragendorff untuk mengetahui adanya alkaloid, reagen sitroborat untuk mengetahui adanya flavonoid, dan reagen FeCl₃ 5% untuk mengetahui adanya tanin (Mubinov *et al.*, 2022).

Uji bioautografi

Uji bioautografi digunakan untuk mendeteksi senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Konsentrasi ekstrak dan fraksi etil asetat yang digunakan yang digunakan berturut-turut yaitu 80% dan 60%. Ekstrak dan fraksi masing-masing ditotolkan pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silica G60 F254 sebanyak 2 μ L menggunakan pipa kapiler dan dilusi menggunakan fase gerak metanol : sikloheksan : diklorometana (60:20:74) v/v/v. Plat yang telah dilusi diangin-anginkan hingga kering dan diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Setelah itu plat ditempelkan pada media Nutrient Agar (NA) yang telah berisi inokulasi bakteri sebanyak 200 μ L dan didiamkan selama 30 menit, diberi tanda pada bawah cawan. Setelah 30 menit, plat diangkat dan diinkubasi cawan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pengamatan hasil dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk (Paputungan *et al.*, 2019).

Analisis Data

Analisis data dari hasil diameter zona hambat antibakteri terlebih dahulu diuji normalitas dan diuji homogenitas apakah data yang dihasilkan normal dan homogen atau tidak, jika data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis menggunakan *Analysis of Varians* (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95% yang bertujuan untuk mengetahui ada

tidaknya pengaruh yang signifikan dari pemberian ekstrak dan fraksi jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Data yang tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka dilanjutkan dengan analisis Non Parametrik menggunakan uji Kruskal-wallis (Kurniawan *et al.*, 2019). Analisis data yang dilakukan untuk uji bioautografi dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan Rf pada zona hambat yang terbentuk dengan hasil identifikasi KLT pada Rf tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

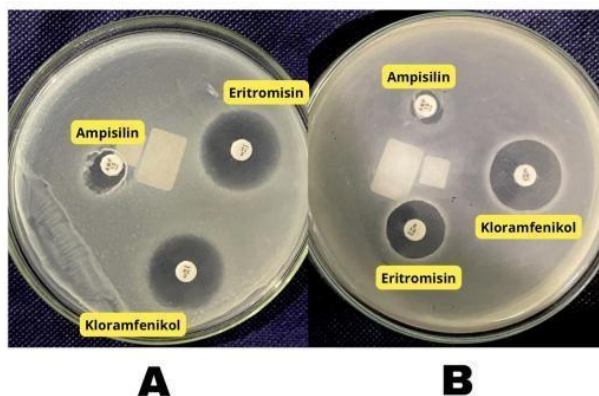
Bobot akhir dari ekstrak jintan hitam yang diperoleh yaitu sebesar 138 gram., sementara untuk bobot fraksi n-heksan, etil asetat dan air berturut-turut adalah 1,79; 1,24; dan 1,66 gram. Hasil rendemen ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air berturut-turut adalah sebesar 13,8; 17,9; 12,4; dan 16,6 %.

Tabel 1. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air

Sampel	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol	1000	138	13,8
Fraksi n-heksan	10	1,79	17,9
Fraksi etil asetat	10	1,24	12,4
Fraksi air	10	1,66	16,6

Uji sensitivitas antibiotik

Tujuan dari uji sensitivitas antibiotik adalah untuk mengetahui sensitivitas atau kepekaan bakteri terhadap suatu antibiotik. Antibiotik yang digunakan untuk uji adalah ampisilin 15µg, eritromisin 15µg dan kloramfenikol 30µg. Uji sensitivitas dilakukan dengan menggunakan metode *disc diffusion*. Zona hambat hasil uji sensitivitas pada bakteri *Shigella sonnei* terhadap antibiotik ampisilin 10 µg, eritromisin 15 µg dan kloramfenikol 30 µg berturut-turut yaitu sebesar 12; 24,6; dan 22,8 mm. Pada bakteri *Bacillus cereus*, zona hambat yang dihasilkan oleh antibiotik ampisilin 10 µg, eritromisin 15 µg dan kloramfenikol 30 µg berturut-turut yaitu sebesar 6;16,5; dan 20,1 mm. Maka, untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak jintan hitam kontrol positif yang digunakan pada bakteri *Shigella sonnei* yaitu eritromisin dan untuk kontrol positif yang digunakan pada bakteri *Bacillus cereus* yaitu kloramfenikol.



Gambar 1. (A) Hasil uji sensitivitas terhadap bakteri *Shigella sonnei*, eritromisin memiliki zona hambat paling besar (B) Hasil uji sensitivitas terhadap bakteri *Bacillus cereus*, kloramfenikol memiliki zona hambat paling besar Keterangan: diameter disk 6 mm

Tabel 2. Hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*

Antibiotik	Rata – rata diameter zona hambat (mm) ± SD (n=3)	
	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Ampisilin 10 µg	12 ± 0,5	6 ± 5,2
Eritromisin 15 µg	24,6 ± 0,6	16,5 ± 0,9
Kloramfenikol 30 µg	22,8 ± 0,8	20,1 ± 2,2

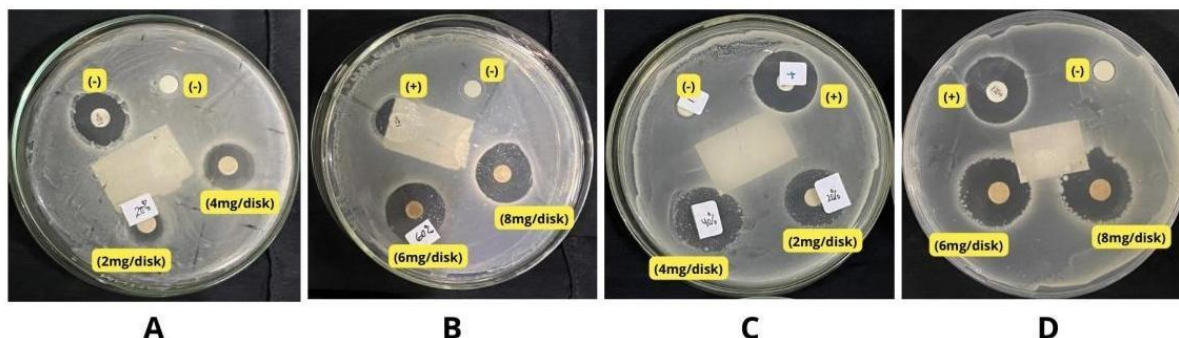
*Keterangan: diameter disk = 6mm

Antibiotik eritromisin bekerja dengan cara berikatan dengan ribosom pada subunit 50S dan juga mengganggu reaksi translokasi peptida (Katzung *et al.*, 2014). Eritromisin menghasilkan zona hambat sangat kecil terhadap bakteri *Bacillus cereus*, dalam penelitian yang dilakukan oleh Terence (2015), menunjukkan bakteri *Bacillus* yang diisolasi dari plak gigi resisten terhadap antibiotik eritromisin. Kloramfenikol merupakan salah satu antibiotik berspektrum luas yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein kuman dengan berikatan pada ribosom 50S sehingga pembentukan rantai peptide akan terhambat (Abdurrachman and Febrina, 2018).

Uji aktivitas antibakteri dengan Metode Disc Diffusion

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol jintan hitam menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/disk serta kontrol positif membentuk zona hambat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar disk. Sementara itu untuk kontrol negatif Dimetil Sulfoksida 5% (DMSO 5%) tidak menunjukkan adanya zona hambat disekitar disk, hal tersebut membuktikan bahwa Dimetil Sulfoksida 5% (DMSO 5%) yang digunakan untuk melarutkan ekstrak untuk membuat varian konsentrasi tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri sehingga penghambatan pertumbuhan bakteri merupakan peran dari ekstrak jintan hitam. Ekstrak etanol jintan hitam dalam berbagai konsentrasi diujikan terhadap bakteri *Shigella sonnei*

menghasilkan zona hambat berkisar antara 9,8 - 21,6 mm dan untuk *Bacillus cereus* menghasilkan zona hambat berkisar antara 9,3 - 19,3cm.



Gambar 2. (A&B) Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri *Shigella sonnei*, (C&D) Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri *Bacillus cereus*

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella sonnei*

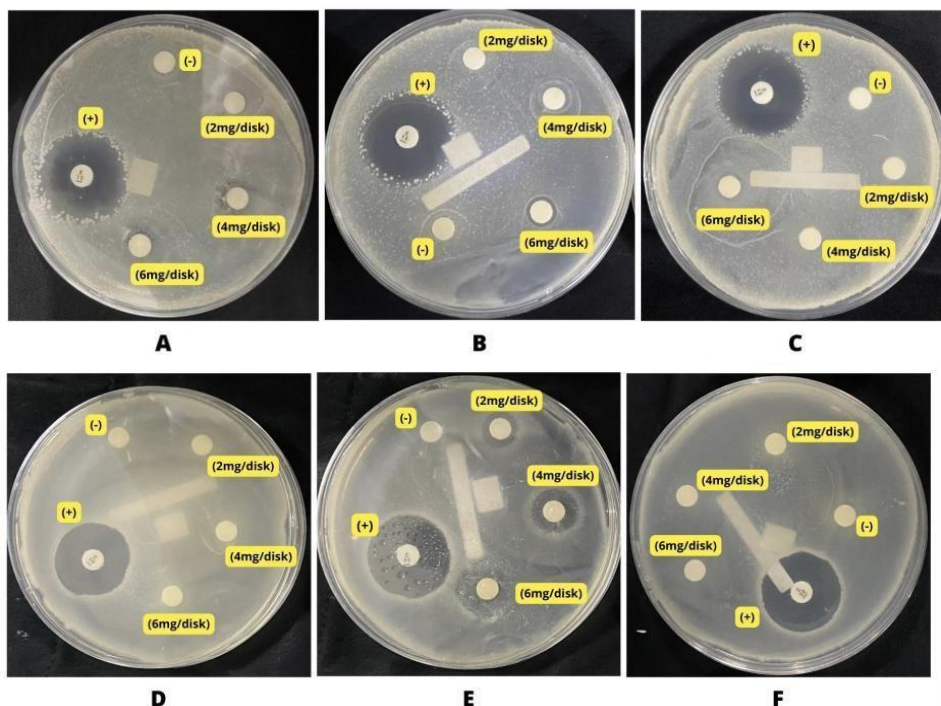
Konsentrasi (mg/disk)	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Bacillus cereus</i>
2	9,8 ± 1,0	9,3 ± 0,6
4	13,5 ± 1,3	13,3 ± 1,2
6	18,6 ± 1,8	18,5 ± 1,5
8	21,6 ± 0,8	19,3 ± 1,5
Eritromisin	25,0 ± 0	-
Kloramfenikol	-	24,7 ± 0,6
(DMSO 5%)	0 ± 0	0 ± 0

*Keterangan : diameter disk 6 mm, Kontrol positif *Shigella sonnei* = Eritromisin, Kontrol positif *Bacillus cereus* = Kloramfenikol Kontrol negatif = DMSO 5%

Pada penelitian ini, konsentrasi 8 mg/disk adalah konsentrasi yang menghasilkan zona hambat paling besar. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin besar diameter zona hambat yang dihasilkan yang disebabkan kandungan senyawa aktif pada konsentrasi lebih tinggi lebih banyak dibandingkan pada konsentrasi rendah (Faozi, 2013). Faktor-faktor teknis yang mempengaruhi ukuran zona hambat pada metode Kirby Bauer antara lain : kepekatan inokulum, waktu inkubasi, waktu penempelan cakram, ketebalan media agar dan komposisi media. Kekeruhan suspensi mempengaruhi diameter zona hambat, jia suspensi terlalu keruh maka diameter zona hambat akan semakin kecil dan jika suspensi kurang keruh maka diameter zona hambat semakin besar (Sumarno, 2000). Ketebalan media agar yang efektif adalah sekitar 4 mm, jika media agar terlalu tipis, maka difusi ekstrak akan menjadi lebih cepat dan jika media agar terlalu tebal, maka difusi ekstrak akan semakin lambat (Zeniusa *et al.*, 2019).

Berdasarkan uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat dan air, hasil menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi air tidak memiliki zona hambat terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Fraksi etil asetat menghasilkan zona hambat dengan rata-rata diameter sebesar 10,0 mm terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan 9,7 mm terhadap bakteri *Bacillus cereus*. Pada penelitian ini ekstrak jintan hitam terbukti mengandung senyawa flavonoid

dan alkaloid sedangkan fraksi etil asetat jantan hitam mengandung senyawa alkaloid. Jika fraksi jantan hitam dibandingkan dengan ekstrak jantan hitam, maka daya antibakteri dari fraksi jantan hitam lebih lemah dibandingkan dengan ekstrak. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan, hal tersebut menunjukkan bahwa diduga metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak bekerja secara sinergis untuk menghasilkan aktivitas antibakteri (Wijaya *et al.*, 2013). Hal tersebut juga disebabkan karena konsentrasi senyawa metabolit pada fraksi yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi pada ekstrak, sehingga aktivitas antibakteri menjadi lebih lemah dan zona hambat yang dihasilkan menjadi kecil.



Gambar 3. (A) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi N-heksan terhadap bakteri *Shigella sonnei* (B) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap bakteri *Shigella sonnei* (C) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air terhadap bakteri *Shigella sonnei* (D) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi N-heksan terhadap bakteri *Bacillus cereus* (E) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap bakteri *Bacillus cereus* (F) Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air terhadap bakteri *Bacillus cereus*. Keterangan: diameter disk 6 mm

Tabel 4. Hasil uji aktivitas fraksi jantan hitam (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella sonnei*

Konsentrasi (mg/disk)	Rata- rata diameter zona hambat (mm) \pm SD (n=3)					
	<i>Shigella sonnei</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
	N-heksan	Etil asetat	Air	N-heksan	Etil asetat	Air
2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
6	0 \pm 0	10,0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	9,7 \pm 0,6	0 \pm 0
Eritromisin	25,0 \pm 0	25,0 \pm 0	25,0 \pm 0	-	-	-
Kloramfenikol	-	-	-	24,7 \pm 0,6	24,7 \pm 0,6	24,7 \pm 0,6
DMSO 5%	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

*Keterangan : diameter disk 6 mm, Kontrol positif *Shigella sonnei* = Eritromisin, Kontrol positif *Bacillus cereus* = Kloramfenikol Kontrol negatif = DMSO 5%

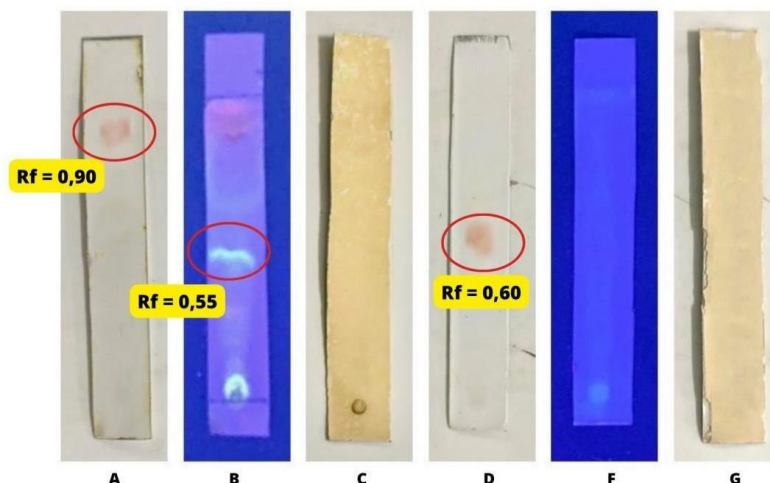
Hasil data dari analisis Kruskal-wallis dan uji lanjutan pengujian aktivitas ekstrak dan fraksi jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* menunjukkan nilai signifikansi 0,007 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan ekstrak dan fraksi yang diberikan terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Hasil menunjukkan bahwa kontrol positif dengan masing-masing ekstrak memberikan aktivitas yang berbeda-beda terhadap penghambatan bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Pada kontrol negatif tidak memberikan efek apapun terhadap kedua bakteri uji. Dari analisis data yang dihasilkan untuk kedua bakteri, masing-masing konsentrasi ekstrak dan fraksi memiliki sifat dan karakteristik yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada ekstrak etanol jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* pada konsentrasi 2, 4,6 dan 8 mg/disk menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap konsentrasi ekstrak yang lainnya. Pada masing-masing bakteri uji, ekstrak dengan konsentrasi 8 mg/disk merupakan ekstrak yang paling baik sedangkan ekstrak terkecil dengan konsentrasi 2 mg/disk masih dapat menghasilkan zona hambat. Pada analisis fraksi terhadap kedua bakteri pada konsentrasi 2, 4, dan 6 mg/disk menunjukkan bahwa konsentrasi fraksi etil asetat yang paling baik adalah 6 mg/disk, sedangkan pada konsentrasi terkecil 2 mg/disk tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Dari data yang didapatkan untuk masing-masing ekstrak dan fraksi memiliki potensi sebagai antibakteri. Menurut Davis dan Stout (1971), terdapat kriteria kekuatan suatu daya antibakteri yang dikategorikan dalam 4 kelas.

Tabel 5. Kategori Zona Hambat

Diameter zona hambat (mm)	Kriteria kekuatan daya antibakteri
<5	Lemah
5-10	Sedang
10-20	Kuat
>20	Sangat kuat

Analisis Kualitatif KLT

Pada uji kualitatif terhadap ekstrak dan fraksi etil asetat jintan hitam, hasil menunjukkan bahwa keduanya mengandung senyawa alkaloid. Pada lempeng KLT dikembangkan menggunakan fase gerak metanol : sikloheksan : diklorometana (60:20:74) v/v/v dan terlihat bahwa bercak ekstrak dengan nilai Rf 0,55 menunjukkan reaksi positif mengandung flavonoid yang menunjukkan fluoresensi warna kuning setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat dan diamati pada sinar UV 366. Pada fraksi etil asetat menunjukkan hasil yang negatif (tidak berfluoresensi). Hasil elusi ekstrak dengan nilai Rf 0,90 dan fraksi etil asetat dengan nilai Rf 0,60 menunjukkan reaksi positif mengandung alkaloid dengan menunjukkan warna jingga setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan diamati pada sinar tampak. Pada lempeng yang disemprot dengan pereaksi FeCl₃ 5% tidak terdeteksi warna ungu kehitaman jika diamati pada sinar tampak yang artinya tidak terdapat kandungan tanin pada ekstrak dan fraksi etil asetat jintan hitam.



Gambar 4. Hasil uji KLT ekstrak dan fraksi jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan fase gerak metanol : sikloheksan : diklorometana (60:20:74) v/v/v dan fase diam silica gel 254

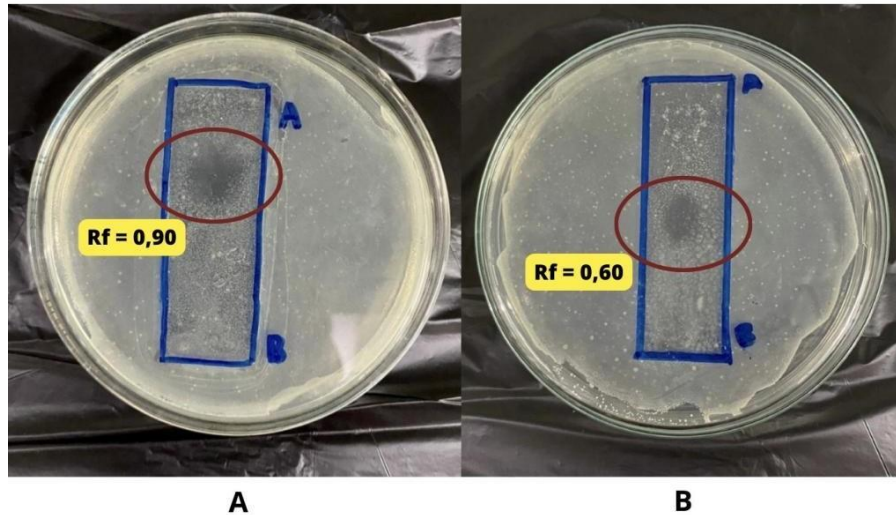
*Keterangan: A: Dragendorff (sinar tampak) ekstrak jintan hitam, B: Sitroborat (UV 366) ekstrak jintan hitam, C: FeCl₃ 5% (sinar tampak) ekstrak jintan hitam, D: Dragendorff (sinar tampak) fraksi jintan hitam, E: Sitroborat (UV 366) fraksi jintan hitam, F: FeCl₃ 5% (sinar tampak) fraksi jintan hitam

Tabel 6. Hasil uji KLT ekstrak dan fraksi jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan fase gerak metanol: sikloheksan: diklorometana (60:24:74) v/v/v dan fase diam silica gel 254

Deteksi	Ekstrak Jintan Hitam			Fraksi etil asetat Jintan Hitam		
	Rf	Hasil	Keterangan	Rf	Hasil	Keterangan
Sitroborat (UV 366)	0,55	Berfluorosensi warna kuning	(+) flavonoid	-	-	(-) flavonoid
Dragendorff (sinar tampak)	0,90	Terdeteksi warna jingga	(+) alkaloid	0,60	Terdeteksi warna jingga	(+) alkaloid
FeCl ₃ 5% (sinar tampak)	-	-	(-) tanin	-	-	(-) tanin

Uji bioautografi

Sebelum dilakukan uji bioautografi dilakukan optimasi fase gerak, dan hasil hasil fase gerak yang digunakan yaitu metanol : sikloheksan : diklorometana (60:20:74) v/v/v. Setelah diinkubasi akan tampak zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri pada titik tertentu yang mengandung senyawa antimikroba (Yasir et al, 2017). Hasil uji bioautografi didapatkan dengan adanya zona bening dengan Rf 0,90 pada ekstrak dan Rf 0,60 pada fraksi etil asetat.



Gambar 5. (A) Hasil uji bioautografi ekstrak Jintan Hitam (B) Hasil uji bioautografi fraksi jintan hitam

Metode bioautografi yang digunakan merupakan metode bioautografi kontak, dimana metode tersebut melibatkan transfer agen mikroba menggunakan cara difusi dari kromatogram (Kromatografi Lapis Tipis) ke media agar yang telah berisi suspensi bakteri. Setelah beberapa menit berdifusi, kromatogram dilepas dan media diinkubasi selama 18-24 jam. Zona hambat muncul di tempat dimana senyawa antimikroba kontak dengan media agar (Balouiri *et al*, 2016). Jika dibandingkan Rf hasil bioautografi dengan Rf hasil analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT), golongan senyawa dengan Rf yang sama merupakan golongan alkaloid. Alkaloid sebagai antibakteri bekerja dengan cara mengganggu komponen yang menyusun peptidoglikan sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel bakteri. Selain itu juga menghambat enzim topoisomerase dan sebagai interkrelator DNA. Jenis alkaloid yang terdapat dalam jintan hitam yaitu *nigelicine*, *nigellimine* dan *nigellimine N-oxide*, *nigellamine* beserta alkaloid *nigellidine* (El-Tahir, 2006).

Pada penelitian ini, ekstrak jintan hitam terbukti mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid. Namun, secara terpisah aktivitas antibakteri pada masing-masing senyawa metabolit terhadap bakteri menjadi lemah. Hal tersebut disebabkan karena noda yang bergerak setelah ditarik oleh memiliki konsentrasi yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi pada ekstrak, sehingga aktivitas antibakteri menjadi lebih lemah.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi jintan hitam (*Nigella sativa*), maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi etil asetat biji jintan hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus*. Ekstrak dengan konsentrasi 6 mg/disk menghasilkan zona hambat sebesar yaitu 18,6 mm pada bakteri *Shigella sonnei* dan 18,5 mm pada bakteri *Bacillus cereus*, sementara itu, fraksi etil asetat dengan konsentrasi 6 mg/disk menghasilkan zona hambat sebesar 10,0 mm pada bakteri *Shigella sonnei* dan 9,7 mm pada bakteri *Bacillus cereus*. Menurut hasil uji bioautografi yang telah dilakukan, kandungan senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh jintan hitam yang berperan aktif sebagai antibakteri terhadap *Shigella sonnei* dan *Bacillus cereus* yaitu alkaloid.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrachman., and Febrina E., 2018. Evaluasi Penggunaan Antibiotik pada Pasien Anak Penderita Demam Tifoid di Rumah Sakit Al Islam Bandung, *Jurnal Farmaka*, 16(2), pp. 87-96.
- Agustianasari I., Mulqie L., Choesrina R., 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, 2(2), pp. 682- 690.
- Arisanti R.R., Indriani C., Wilopo S.A., 2018. Kontribusi agen dan faktor penyebab kejadian luar biasa keracunan pangan di Indonesia: kajian sistematis, *BKM Journal of Community Medicine and Public Health*, 334(3), pp. 99-106.
- Azizah M., Lingga L.S., Rikmasari Y., 2020. Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens* L.) dan madu hutan terhadap beberapa bakteri penyebab penyakit kulit, *Jurnal Penelitian Sains*, 22 (1), pp. 37-44.
- Balouri M., Sadiki M., Ibsouda S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity, A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71-79.
- Davis W.W., Stout T.R., 1991. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay, *Microbiology*, 22(4), pp. 659-665.
- El-Tahir K.E.H., 2006. The Black Seed *Nigella sativa* Linnaeus - A Mine for Multi Cures: A Plea for Urgent Clinical Evaluation of its Volatile Oil, *J T U Med Sc*, 1(1), pp. 1-19.
- Faozi G., 2013. Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In-Vitro, *Skripsi*, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto.
- Hayati Z., Azwar., Puspita I., 2012. Pola dan Sensitivitas Antibiotik Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Penyebab Infeksi Nosokomial di Ruang Rawat Bedah RSUDZA Banda Aceh, *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 10 (3), pp. 158-166.
- Hidayat L.N.R., Riyadi S.A., Gustiani S., Dwicahya A., 2022. Aplikasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) sebagai zat antibakteri pada kain kapas dengan variasi metode., *Jurnal Arena Tekstil*, 37(1), pp. 9-18.
- Katzung B.G., 2014. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Kurniawan E., Jekti D.S.D. and Zulkifli L., 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Batang Bidara Laut (*Strychnos ligustrina*) Terhadap Bakteri Patogen, *Jurnal Biologi Tropis*, 19(1), pp. 61-69.
- Marlinda L., 2015. Effectivity of black cumin seeds extract to increase phagocytosis, *Journal Majority*, 4(3), pp. 58-64.
- Merta I.W., Nuidja I.N., Marwati N.M., 2013. Ekstrak Gambir Memiliki Daya Hambat Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in Vitro, *Journal Skala Husada*, 10(1), pp.

39-43.

- Mohammad M.A., Mohamad M.M. and Dradka H., 2009. Effect of Black Seed (*Nigella sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2), pp. 386-390.
- Mubinov A.R., Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Kolpakova S.D., Zhestkov A.V., 2022. Phytochemical And Microbiological Aspects Of The *Nigella sativa* L. Herbs Study, *Scientific and Practical Journal*, 10(3), pp. 244-254.
- Novard M.F.A., Suharti N., Rasyid R., 2019. Gambaran bakteri penyebab penyakit pada anak berdasarkan jenis spesimen dan pola resistensinya di laboratorium RSUP Dr. M. Djamil Padang tahun 2014-2016, *Jurnal Kesehatan Andalas*, 8(2), pp. 26-32.
- Paputungan W.A., Lolo W.A., Siampa J.P., 2019. Aktivitas Antibakteri Dan Analisis KLT-Bioautografi Dari Fraksi Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora Pierre Ex A. Froehner*), *Pharmakon*, Program Studi Farmasi , FMIPA, Universitas Sam Ratulangi, 8(3), pp. 516-524.
- Sopandi T. and Wardah., 2014. *Mikrobiologi Pangan Teori dan Praktik*. Indonesia: Andi Publisher. Yogyakarta 494 hal.
- Sumarno., 2000. Teknik Dasar Pemeliharaan Mikroba, *Intan Prawira*, Jakarta.
- Terence K., 2015. Uji Resistensi Bakteri *Bacillus sp* yang Diisolasi dari Plak Gigi Terhadap Merkuridan Eritromisin, *Skripsi*, Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Wadud S.A., 2014. Uji Efektifitas Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Negri Hidayatullah, Jakarta.
- Wendersteyt N.V., Wewengkang D.S., Abdullah S.S., 2021. Antimicrobial Activity Test Of Extracts And Fractions Of Ascidian *Herdmania momus* From Bangka Island Waters Likupang Against The Growth Of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium*, And *Candida albicans*, *Pharmakon*, 10(1), pp.706-712.
- Wijaya V., Supriyatna., Milanda T., 2013. Daun Tendani (*Goniothalamus macrophyllus Hook. f. & Thomson.*), Suatu Obat Tradisional Antibakteri Suku Dayak Punan di Klimantan Timur, *Fitofarmaka*, 3(2), pp. 2087-9164.
- Wijayati N., Astutiningsih C., Mulyati S., 2014. Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923, *Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), pp. 25-28.
- Yasir Y., Yuniati., Paramita S., Zubaidah M., Mu'ti A., Danial., 2017. Analisis Bioautografi Dengan Kromatografi Lapis Tipis Pada Ekstrak Etanol Daun *Caesalpinia sumatrana* ROXB. Terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Monoklonal, *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman Samarinda, 1(7), pp. 359-366.
- Yenny ., Herwana E., 2007. Resistensi dari bakteri enterik : aspek global terhadap antimikroba, *Journal Universa Medicina*, 26(1), pp. 46-46.

Zeniusa P., Ramadhian M.R., Nasution S.H., Karima N., 2019. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau Terhadap *Escherichia coli* secara In Vitro, *Majority*, 8(2), pp. 136-143.