

PENGARUH PEMBERIAN MINYAK *Nigella sativa* DAN KOMBINASINYA DENGAN SEFTRIAKSON TERHADAP JUMLAH KUMAN Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PADA KULTUR OTAK MENCIT BALB/c

Bernadetta Via Marga U¹, Edi Dharmana², Purnomo Hadi³

¹ Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³ Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang -Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang Kasus infeksi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) dilaporkan masih tinggi. Hal tersebut dikarenakan resistensinya terhadap berbagai antibiotik, maka dari itu WHO menyarankan penemuan antibiotik baru, penelitian ini memanfaatkan minyak *N.sativa* yang memiliki efek antibakteri dan imunomodulator. Kombinasi minyak *N.sativa* dengan seftriakson diharapkan mampu mengatasi kasus infeksi MRSA.

Tujuan Mengetahui pengaruh pemberian minyak *N.sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson terhadap jumlah kuman MRSA pada kultur otak mencit BALB/c.

Metode Penelitian eksperimen laboratorium murni dengan post test only control group design. Jumlah sampel 20 ekor mencit BALB/c jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok dan diadaptasi selama 7 hari. Setiap kelompok diinfeksi dengan MRSA ATCC 43300 0,2ml, setelah 16 jam kelompok K diberi aquabidest 0,03 ml, P1 diberi seftriakson 0,03 ml, P2 diberi minyak *N.sativa* 0,3 ml, P3 diberi terapi seftriakson 0,03 ml dan minyak *N.sativa* 0,3 ml, 8 jam kemudian dilakukan terminasi. Uji normalitas data menggunakan uji Saphiro-wilk dilanjutkan dengan uji Kruskal- Wallis dan uji Mann- Whitney.

Hasil Hasil rerata jumlah kuman pada kultur otak, K= $128 \times 10^3 \pm 157,25 \times 10^3$ cfu/ml; P1= $4,18 \times 10^3 \pm 3,22 \times 10^3$ cfu/ml; P2= $0,12 \times 10^3 \pm 0,11 \times 10^3$ cfu/ml; P3= $0,68 \times 10^3 \pm 1,30 \times 10^3$ cfu/ml. Terdapat perbedaan yang bermakna antara K dengan P2 (p=0,009) dan P3(p=0,028), sedangkan dengan P1(p=0,346) tidak bermakna. Jumlah kuman antara P1 dengan P2(p=0,009) dan P3(p=0,028) memiliki perbedaan bermakna, antara P2 dengan P3(p=0,754) memiliki perbedaan tidak bermakna.

Kesimpulan Pemberian minyak *N.sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson dapat menurunkan jumlah kuman MRSA pada kultur otak mencit BALB/c.

ABSTRACT

THE EFFECT OF *Nigella sativa* OIL AND ITS COMBINATION WITH CEFTRIAZONE TOWARD Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) GROWTH IN BRAIN OF BALB/c MICE

Background Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection cases reported to be high. This matter is caused by the bacteria resistance to many antibiotics, from this point WHO suggested to looking for new antibiotics, in this research utilize *N.sativa* oil that have antibacterial and immunomodulator effects. The combination of *N.sativa* oil with ceftriazone is expected to resolve MRSA infection cases.

Aims To investigate the effect of *N.sativa* oil administration and its combination with ceftriazone toward MRSA bacteria count in cultured brain of BALB/c mice.

Methods Experimental laboratory with post test only control group design. Total sample were 20 male BALB/c mice randomized into 4 groups and adapted for 7days. Every group was injected with MRSA ATCC 43300 0,2ml, after 16 hours K was given aquabidest 0,03 ml, P1 was given ceftriaxone 0,03 ml, P2 was given N.sativa oil 0,3 ml, P3 was given ceftriaxone 0,03 ml and N.sativa 0,3 ml, after 8 hours would be terminated. Data normality test used Saphiro-wilk test followed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test.

Results The result of the average number of MRSA on brain culture, K= $128 \times 10^3 \pm 157,25 \times 10^3$ cfu/ml; P1= $4,18 \times 10^3 \pm 3,22 \times 10^3$ cfu/ml; P2= $0,12 \times 10^3 \pm 0,11 \times 10^3$ cfu/ml; P3= $0,68 \times 10^3 \pm 1,30 \times 10^3$ cfu/ml. Significant differences was found between K with P2 (p=0,009) and P3(p=0,028), while with P1(p=0,346) wasn't. Bacteria count between P1 with P2(p=0,009) and P3(p=0,028) showed a significant differences, and between P2 with P3(p=0,754) there was no significant difference.

Conclusion Administration of Nigella sativa oil and its combination with ceftriaxone can decrease number of MRSA bacteria in BALB/c mice's brain cultures.

Keywords : MRSA, ceftriaxone, N.sativa oil , in vivo, bacteria count

PENDAHULUAN

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) adalah bakteri *S.aureus* yang resisten terhadap antibiotik metisilin. Bakteri ini memiliki banyak faktor virulensi seperti leukosidin, kinase, hialuronidase, protease, lipase, dan elastase yang membuat *S.aureus* mampu bermetastasis ke berbagai organ, dan mengakibatkan terjadinya endokarditis, osteomielitis hematogen akut, infeksi paru, meningitis dan abses otak.¹⁻³

Isolat MRSA ditemukan awal tahun 1960 dan menjadi salah satu penyebab utama infeksi nosokomial di berbagai negara.² Sejak saat itu infeksi MRSA menjadi permasalahan dunia, persentasenya mencapai 30-70 %. Kasusnya di Asia cukup tinggi yaitu 70% pada tahun 2007, sedangkan di Asia Tenggara menurut *World Health Organization* (WHO) mencapai 81 % dan 37 % menyebabkan bakterimia serta meningitis. Data nasional Indonesia tahun 2006 kasus MRSA mencapai 23,5%.⁴⁻⁶

Resistensi *S.aureus* terhadap antibiotik dikarenakan adanya gen *mecA* yang menyandi perubahan *protein binding penicillin* (PBP) 2 menjadi PBP2a, sehingga afinitasnya terhadap antibiotik betalaktam menjadi sangat rendah. Akibatnya antibiotik ini tidak dapat menghambat proses transpeptidasi pada pembentukan dinding sel. MRSA dalam perkembangannya menjadi galur multi resisten, bakteri ini tidak hanya resisten terhadap antibiotik golongan betalaktam tetapi juga terhadap antibiotik non betalaktam. Pilihan terakhir dilakukan terapi dengan menggunakan vankomisin, namun beberapa strain MRSA ditemukan resisten terhadap antibiotik tersebut.^{2, 7, 8}

Berdasarkan fakta tersebut maka WHO menyarankan untuk menemukan terapi baru yang mampu mengatasi infeksi MRSA.^{2, 7} Penelitian ini memilih minyak *Nigella sativa* (*N.sativa*) yang memiliki banyak efek farmakologi, seperti antibakteri, imunomodulator, antiparasit, antivirus, antijamur, antioksidan, antiinflamasi, antimalaria dan antitumor.^{4, 9-11} Minyak *N.sativa* mengandung zat aktif seperti timokuinon (TQ), ditimokuinon (DTQ), timohidrokuinon (THQ), timol (THY) dan tanin.^{4, 12} TQ sebagai antibakteri bekerja secara selektif, artinya tidak semua bakteri terpengaruh oleh sifat antibakterinya, akan tetapi hampir seluruh bakteri gram positif terpengaruh oleh daya antibakteri *N.sativa*. Aktivitas tertinggi terjadi pada strain *S.aureus*, baik yang sensitif maupun resisten terhadap metisilin.¹³ *N.sativa* memiliki efek potensial meningkatkan imunitas seluler, meningkatkan rasio sel CD4:CD8, meningkatkan fungsi sel NK dan makrofag, serta meningkatkan produksi beberapa sitokin seperti IL-1, IL-3, IL-6, IL-10, TNF- α , dan VGEF.¹⁴⁻¹⁶

Penelitian ini berbeda dari penelitian sebelumnya karena menggunakan teknik *in vivo* dan melakukan kombinasi minyak *N.sativa* dengan seftriakson. Antibiotik ini terpilih karena mampu berada dalam cairan serebrospinal dengan kadar tinggi, sehingga dapat mengatasi infeksi di susunan saraf pusat.¹⁷ Beberapa data menunjukkan bahwa mulai terdapat resistensi seftriakson pada bakteri yang memproduksi *extended-spectrum β laktamase* (ESBL).^{18, 19} Berdasarkan hal tersebut diharapkan kombinasi minyak *N.sativa* dengan seftriakson memiliki interaksi yang baik untuk mengatasi infeksi MRSA. Dosis minyak *N.sativa* yang digunakan sesuai penelitian sebelumnya yaitu 0,3 ml.¹⁶ Seftriakson yang digunakan 0,03 ml tiap mencit. Indikator keberhasilan terapi dilihat dari jumlah kuman MRSA pada kultur otak mencit BALB/c.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dengan *post test only control group design*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2015 di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Mikrobiologi FK Undip. Sampel adalah 24 ekor mencit BALB/c jantan, usia 7-9 minggu, berat badan 25 gram, dan kondisi sehat. Subyek dirandomisasi sederhana dan dibagi menjadi 4 kelompok kemudian diadaptasi selama 7 hari. Semua kelompok diinfeksi dengan MRSA ATCC 43300 setelah adaptasi, 16 jam setelah diinfeksi kelompok K diberi *aquabidest* 0,03 ml intraperitoneal, kelompok P1 diberi seftriakson 0,03 intraperitoneal, kelompok P2 diberi minyak *N.sativa* 0,3 ml menggunakan

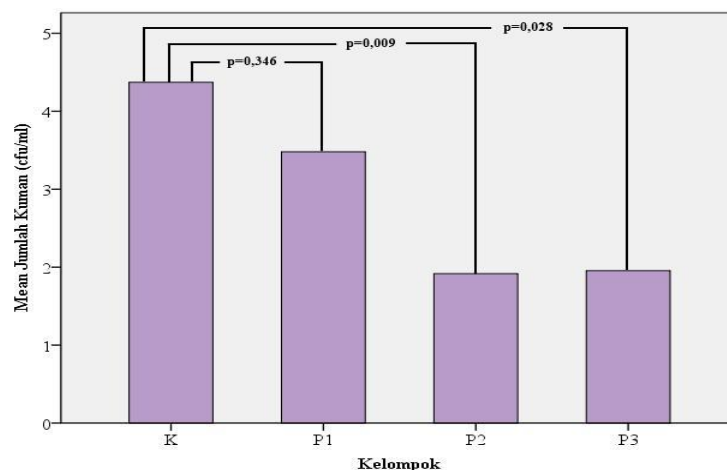
sonde lambung. Delapan jam setelahnya dilakukan terminasi dan isolasi otak untuk dikultur. Otak yang diambil diberikan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} kemudian ditanam pada media *nutrient agar* dengan *plate count method* menggunakan teknik *streak-plate*. Penghitungan jumlah kuman dalam cfu/ml dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada inkubator.

HASIL

Tabel 5. Rerata Jumlah Kuman pada Kultur Otak

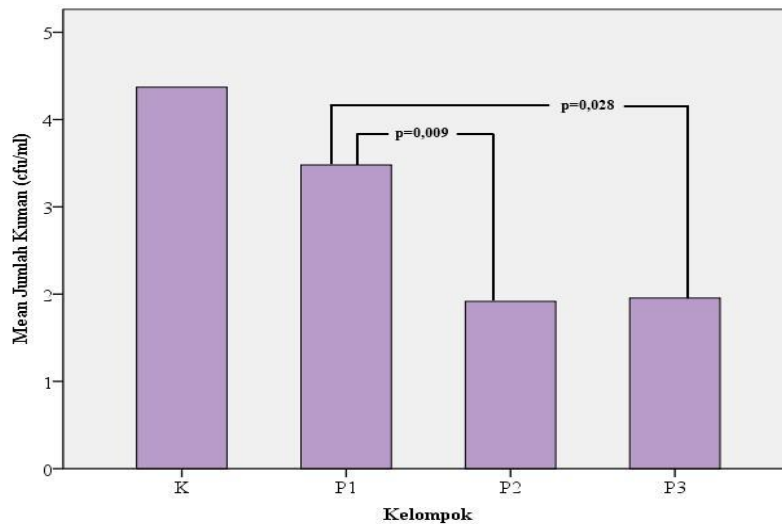
Variabel	Mean \pm SD (10^3 cfu/ml)
K	128 \pm 157,25
P1	4,18 \pm 3,22
P2	0,12 \pm 0,11
P3	0,68 \pm 1,30

Nilai rerata pada 3 kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (K). Nilai rerata terendah didapatkan pada kelompok P2 yaitu $0,12 \times 10^3$ cfu/ml. Uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*, selanjutnya menggunakan uji *Kruskal- Wallis* dan didapatkan $p=0,006$. Data memiliki perbedaan yang bermakna, kemudian untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan data yang bermakna maka dilakukan uji *Mann- Whitney*.



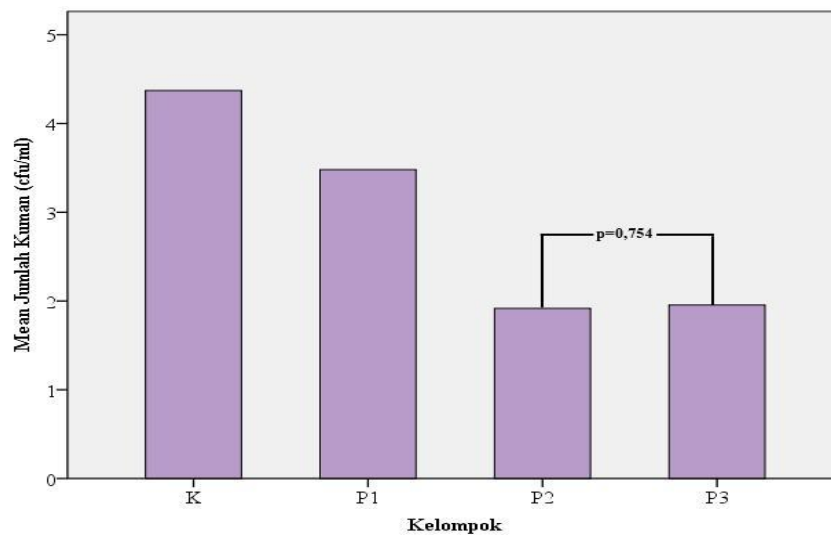
Gambar 1. Grafik hasil uji *Mann- Whitney* perbedaan jumlah kuman MRSA antara kelompok K dengan kelompok perlakuan

Gambar di atas menunjukkan perbedaan jumlah kuman MRSA yang tidak bermakna antara kelompok K dengan kelompok P1 ($p=0,346$). Perbedaan jumlah kuman MRSA yang bermakna antara kelompok K dengan kelompok P2 ($p=0,009$) dan kelompok P3 ($p=0,028$).



Gambar 2. Grafik hasil uji *Mann-Whitney* perbedaan jumlah kuman MRSA antara kelompok P1 dengan P2 dan P3

Grafik tersebut menunjukkan perbedaan jumlah kuman MRSA yang bermakna antara kelompok P1 dengan kelompok P2 ($p=0,009$) dan kelompok P3 ($p=0,028$).



Gambar 3. Grafik hasil uji *Mann-Whitney* perbedaan jumlah kuman MRSA antara kelompok P2 dengan kelompok P3

Gambar 3 menunjukkan perbedaan jumlah kuman MRSA yang tidak bermakna antara kelompok P2 dengan kelompok P3 ($p=0,754$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian didapatkan jumlah kuman antara kelompok K dan P1 tidak mengalami penurunan yang bermakna. Antibiotik golongan sefalosporin bekerja dengan mempengaruhi enzim autokalitik, pada MRSA terjadi inaktivasi dari enzim autokalitik yang disandi oleh gen *lytH*, sehingga sefalosporin tidak dapat menghambat pertumbuhan MRSA, kehilangan aktivitas autolitik juga dapat meningkatkan derajat resistensi MRSA.² Penelitian lain menyatakan bahwa penggunaan sefalosporin generasi ketiga perlu mendapat perhatian khusus karena terdapat kejadian resistensi antibiotika tersebut terhadap bakteri yang memproduksi *extended-spectrum β laktamase* (ESBL) atau bakteri yang mengekspresikan betalaktamase berspektrum luas, MRSA adalah bakteri yang menghasilkan enzim betalaktamase.²⁰

Penurunan jumlah kuman antara kelompok K dengan P2 dan P3 adalah bermakna. Kandungan aktif *N.sativa* yang diketahui mekanismenya dalam membunuh bakteri adalah THQ yang menghambat proses replikasi bakteri dengan mempengaruhi enzim girase dan topoisomerase IV. Fenilpropanoid mampu membuat denaturasi protein membran sel bakteri sehingga menyebabkan kerusakan membran sel dan berujung dengan kematian bakteri. THQ dan THQ dapat membentuk kompleks yang ireversibel dengan asam amino nukleofilik pada protein bakteri sehingga menyebabkan inaktivasi protein. Tanin bekerja dengan cara mengadakan ikatan hidrofobik dengan protein bakteri, menginaktivasi adhesi, enzim dan protein transpor dinding sel, sehingga mengganggu pertumbuhan bakteri. Saponin menghambat proses translasi dalam sintesis protein dengan cara mengikat ribosom sub unit 30S, sehingga menyebabkan akumulasi sub unit 50S yang berakibat fatal.^{12, 21}

Penelitian yang dilakukan oleh Eman Halawani membuktikan bahwa kandungan TQ dari *N.sativa* pada dosis 3 μ g/ml dan 6 μ l/ml dapat menghambat dan membunuh MSSA maupun MRSA secara *in vitro*. Hal tersebut sangat menarik karena isolat klinis *S.aureus* resisten terhadap sebagian besar antibiotik.²² Abdul Hannan menyebutkan konsentrasi hambat minimal dari ekstrak *N.sativa* terhadap MRSA ATCC 25923 adalah 0,5mg/ml dan beberapa MRSA strain lain mulai bisa terhambat pada dosis 4mg/disc secara *in vitro*.⁹ Penelitian Aditya Amrullah dan Mieke Satari membuktikan bahwa minyak *N.sativa* mampu menghambat kuman MRSA pada MIC 1% dengan waktu kontak lebih dari 4 menit secara *in vitro*.¹² *N. sativa* sebagai imunomodulator juga berperan dalam meningkatkan imunitas non spesifik

sebagai pertahanan pertama terhadap infeksi. *N.sativa* diketahui mampu meningkatkan fungsi sel NK dan makrofag, meningkatkan produksi TNF- α yang akan meningkatkan aktivitas dari makrofag.^{14, 23, 24}

Penurunan jumlah kuman antara kelompok P1 dengan P2 dan P3 adalah bermakna, sedangkan antara kelompok P2 dan P3 tidak bermakna. Secara *in vitro* kombinasi *N.sativa* dengan antibiotik ampicilin, sefaleksin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, sulfametoksazol, dan siprofloksasin menunjuk hasil yang sensitif dalam menghambat MSSA maupun MRSA.²² Penelitian kombinasi seftriakson dengan *N.sativa* sampai saat ini belum pernah dilakukan. Berbeda dengan interaksi yang terjadi pada beberapa antibiotik di atas yaitu memberi efek adiktif maupun sinergis, hasil kombinasi seftriakson dengan minyak *N.sativa* secara *in vivo* tidak lebih baik dibandingkan pemberian tunggal minyak *N.sativa*, oleh karena itu membutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara seftriakson dengan minyak *N.sativa*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pemberian minyak *N.sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson dapat menurunkan jumlah kuman MRSA pada kultur otak mencit BALB/c. Penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis pada setiap kelompok untuk mengetahui dosis kombinasi antibiotik dengan minyak *N.sativa* secara tepat agar mendapatkan penurunan jumlah kuman MRSA paling baik. Penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis untuk mengetahui dosis kombinasi maksimal yang dapat menyebabkan toksisitas. Penelitian lebih lanjut tentang pengaruh faktor imunitas mencit yang berperan dalam infeksi MRSA. Penelitian lebih lanjut membandingkan terapi minyak *N.sativa* dengan antibiotik yang masih sensitif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical Microbiology. United States. 25th ed.2006.
2. Yuwono Y. *Staphylococcus aureus* dan Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 2012.
3. Kielian T, Haney A, Mayes PM, Garg S, Esen N. Toll-like receptor 2 modulates the *proinflammatory* milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infection and immunity*. 2005;73(11):7428-35.
4. Clorinda FR. Uji Kemampuan Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. 2013.
5. Karuniawati A, Kiranasari A, Ikaningsih I, Kadarsih R. Emerging Resistance Pathogen: Recent Situation in Asia, Europe, USA, Middle East, and Indonesia. *Journal of the Indonesian Medical Association*. 2011;57(03).
6. Organization WH. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance: World Health Organization; 2014.
7. Fuda C, Fisher J, Mobashery S. β -Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*: The Adaptive Resistance of a Plastic Genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;62(22):2617-33.
8. Satari MH, Wartadewi FGR. Sensitivity Test Cefoxitin (Second Generation of Cephalosporin) and Cefepime (Fourth Generation of Cephalosporin) Towards Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 2013.
9. Hannan A, Saleem S, Chaudhary S, Barkaat M, Arshad MU. Anti Bacterial Activity of *Nigella sativa* Against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008;20(3):72-4.
10. Ahmad I, Tripathi J, Sharma M, Karchulli M, Umer L. *Nigella sativa*- A medicinal Herb with Immense Therapeutic Potential (A Systematic Review). 2014.
11. Sari AIP. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Produksi NO Makrofag Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*: Medical Faculty; 2009.
12. Amarullah Aditya HSM. Efektivitas Daya Antibakteri Habattusaudah terhadap *Staphylococcus aureus* Resisten Methicilin (MRSA). 2013.
13. Jamil AS, Adi B, Prasaja B, Ariani A, Hardi Z. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji *Nigella sativa* terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik secara In vitro dan In vivo. *Pharmacy, Jurnal Farmasi Indonesia*. 2014;11(02).
14. Salem ML. Immunomodulatory and Therapeutic Properties of the *Nigella sativa L.* Seed. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13):1749-70.
15. Hapsari DA, Dharmana E. Pengaruh Pemberian Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Dosis Bertingkat terhadap Parasitemia Mencit BALB/c yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*: Diponegoro University; 2011.

16. Büyüköztürk S, Gelincik A, Özşeker F, Genç S, Şavran FO, Kıran B, et al. *Nigella sativa* (black seed) Oil Does Not Affect the T-helper 1 and T-helper 2 type Cytokine Production from Splenic Mononuclear Cells in Allergen Sensitized Mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(3):295-8.
17. Biantoro IK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 2008
18. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic & Clinical Pharmacology*. 2004.
19. Davies TA, Page MG, Shang W, Andrew T, Kania M, Bush K. Binding of ceftobiprole and comparators to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(7):2621-4.
20. Febiana T, Hapsari M, Hapsari R. *Kajian Rasionalitas Penggunaan Antibiotik di Bangsal Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang Periode Agustus-Desember 2011: Fakultas Kedokteran*; 2012.
21. Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, LeBlanc DJ. *Oral Microbiology and Immunology: ASM press*. 2006.
22. Halawani E. Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa L.* and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advances in Biological Research*. 2009;3(5-6):148-52.
23. G Johnson Arthur, G Siegler Richard, Louise H. *Essential: Mikrobiologi dan Imunologi*. 5 ed. 2011.
24. Boedina KS. *Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi keempat Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2001.