

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

Lovenia Valencia<sup>1</sup>, Edi Dharmana<sup>2</sup>, Purnomo Hadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup> Staf Pengajar Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

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

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang:** *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin dan berbagai macam antibiotik lainnya. Penelitian sedang dikembangkan untuk mencari terapi baru pada infeksi MRSA. *Nigella sativa* memiliki efek antibakteri. Pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap jumlah kuman MRSA secara *in vivo* belum pernah diteliti.

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

**Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dengan *post test only control group design*. Jumlah sampel 20 ekor mencit BALB/c jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok K diberi aqua bidestilata 0,03 ml secara intraperitoneal, P1 diberi seftriakson 0,03 ml secara intraperitoneal, P2 diberi minyak *Nigella sativa* 0,3 ml secara per oral, P3 diberi kombinasi seftriakson 0,03 ml dan minyak *Nigella sativa* 0,3 ml. Sampel diinjeksikan kuman MRSA 0,2 ml ( $10^7$  cfu/ml) secara intraperitoneal pada jam ke-0. Perlakuan diberikan pada jam ke-16 kemudian diterminasi pada jam ke-24. Uji statistik menggunakan uji Kruskal Wallis dan uji Mann-Whitney.

**Hasil:** Hasil rerata jumlah kuman MRSA pada kultur limpa kelompok K= $124,00 \times 10^3 \pm 160,70 \times 10^3$ ; P1= $24,08 \times 10^3 \pm 26,53 \times 10^3$ ; P2= $0,78 \times 10^3 \pm 1,52 \times 10^3$ ; P3= $6,05 \times 10^3 \pm 13,38 \times 10^3$ . Terdapat penurunan jumlah kuman MRSA yang bermakna pada kultur limpa kelompok kontrol terhadap P2 (p=0,016) dan P3 (p=0,046) dan P1 terhadap P2 (p=0,016) dan P3 (p=0,047). Tidak ada perbedaan bermakna antara kontrol dengan P1 (p=0,674) dan P2 dengan P3 (p=0,0596).

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

**Kata kunci:** MRSA, *Nigella sativa*, seftriakson, *in vivo*

### **ABSTRACT**

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

**Background:** Levels of serum albumin can be used as a predictor of morbidity and mortality in the elderly. Reduced serum albumin concentration can be caused by oxidative modification due to aging or insufficient protein intake. SOD as an enzymatic antioxidant might prevent

oxidative stress so that albumin modification process can be inhibited. SOD supplementation was expected to increase serum albumin levels.

**Aim:** To prove the effect of *Nigella sativa* oil and its combination with ceftriaxone toward MRSA count in BALB/c mice's spleen culture.

**Methods:** This was true laboratory experimental study with post test only control group design. The samples were 20 males BALB/c mice, randomized into 4 groups. Control was given 0,03 ml aquabidest injected intraperitoneally, P1 was given 0,03 ml ceftriaxone injected intraperitoneally, P2 was given 0,3 ml *Nigella sativa* oil orally and P3 was given the combination of 0,03 ml ceftriaxone and 0,3 ml *Nigella sativa* oil. 0,2 ml ( $10^7$  cfu/ml) MRSA was injected intraperitoneally at the hour 0. The treatment was given at the hour 16 and mice were terminated at the hour 24. Kruskal-Wallis Test and Mann-Whitney Test is used to analyze the data.

**Results:** Results of the mean number of MRSA bacteria in spleen culture were  $K=124 \times 10^3 \pm 160,70 \times 10^3$ ;  $P1=24,08 \times 10^3 \pm 26,53 \times 10^3$ ;  $P2=0,78 \times 10^3 \pm 1,52 \times 10^3$ ;  $P3=6,05 \times 10^3 \pm 13,38 \times 10^3$ . The number of MRSA bacteria decreased significantly between control group compared to P2 ( $p=0,016$ ) and P3 ( $p=0,046$ ) and P1 compared to P2 ( $p=0,016$ ) and P3 ( $p=0,047$ ). There were no significance between control compared to P1 ( $p=0,674$ ) and P2 toward P3 ( $p=0,596$ ).

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

**Keywords:** MRSA, *Nigella sativa*, ceftriaxone, in vivo

## PENDAHULUAN

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan salah satu penyebab tersering infeksi di negara maju dan berkembang.<sup>1</sup> Ciri khas infeksi *S. aureus* adalah radang supuratif (bernanah) pada jaringan lokal dan cenderung menjadi abses. Infeksi superfisial ini dapat menyebar ke jaringan yang lebih dalam menimbulkan osteomielitis, artritis, endokarditis dan abses pada otak, paru, ginjal, limpa dan kelenjar payudara.<sup>2,3</sup> *S. aureus* juga ditemukan sebagai organisme komensal yang berkolonisasi di *nares anterior* pada satu per tiga populasi manusia sehat. Mekanisme ini meningkatkan resiko penularan infeksi *S. aureus* melalui kontak langsung.<sup>1</sup>

Masalah infeksi bakteri ini sulit teratasi mulai tahun 1960-an, pada saat ditemukannya galur *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin yaitu *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).<sup>1-3</sup> Resistensi MRSA terhadap antimikroba golongan  $\beta$ -laktam disebabkan oleh gen *mecA*, yang merupakan bagian dari *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*), suatu *mobile genetic element* yang mengkode *Penicillin-Binding Protein 2a* (PBP 2a). Afinitas PBP 2a terhadap antimikroba golongan  $\beta$ -laktam sangat rendah sehingga MRSA akan tetap hidup meskipun terpapar antimikroba tersebut dalam konsentrasi tinggi.<sup>2,4</sup>

Awalnya, MRSA muncul sebagai infeksi nosokomial di rumah sakit di berbagai daerah di dunia, yang kemudian dikenal sebagai *Hospital-Acquired* MRSA (HA-MRSA). Galur baru MRSA, yaitu *Community-Acquired* MRSA (CA-MRSA) mulai ditemukan pada tahun 1990-an di Australia, kemudian diikuti dengan penemuan di Amerika Serikat dan saat ini sudah menyebar ke banyak negara.<sup>1,2,4</sup> Persentase MRSA cukup tinggi di Asia, seperti di Taiwan 60%, Cina 20%, Hongkong 70%, Filipina 5% , Singapura 60% dan Indonesia 23,5%.<sup>5</sup> Seftriakson merupakan sefalosporin generasi ketiga. Antibiotik ini memiliki cakupan gram negatif yang lebih luas dan mampu melintasi sawar darah otak.<sup>6</sup> Mekanisme kerja seftriakson berbeda dengan penisilin, yaitu berikatan dengan *Penicillin-Binding Protein 1* (PBP 1) dan *Penicillin-Binding Protein 3* (PBP 3), bukan *Penicillin-Binding Protein 2* (PBP 2).<sup>7</sup> Terhambatnya proses transglukosilasi dan transpeptidase menyebabkan terhambatnya sintesis peptidoglikan pada dinding sel.<sup>8</sup> Obat-obatan  $\beta$ -laktam memiliki efek bakterisidal dengan memicu enzim autolitik pada dinding sel.<sup>1,8</sup> Saat ini ditemukan bahwa galur yang mengekspresikan  $\beta$ -laktamase berspektrum luas sudah resisten terhadap seftriakson maupun golongan sefalosporin generasi-ketiga lainnya.<sup>6</sup>

MRSA dinyatakan sebagai galur multiresisten pada penelitian lebih lanjut. MRSA resisten terhadap seluruh golongan  $\beta$ -laktam dan golongan non  $\beta$ -laktam yaitu makrolida (eritromisin), inhibitor sintesa protein (tetrasiklin dan kloramfenikol) dan kuinolon.<sup>2,9</sup> Sebagai akibat dari multiresisten ini, pemilihan obat semakin sulit dan terbatas. Vankomisin merupakan obat pilihan terapi saat ini. *S.aureus* mulai dikhawatirkan mengalami penurunan kepekaan terhadap vankomisin sejak 1996.<sup>10</sup>

Banyak penelitian dikembangkan untuk mencari terapi baru MRSA, di antaranya menggunakan *Nigella sativa* (*N. sativa*). *N. sativa* atau yang dikenal sebagai jintan hitam merupakan tanaman obat yang pertama kali ditemukan di Asia Barat kemudian menyebar secara luas ke berbagai negara, seperti Timur Tengah, Eropa Selatan, Siria, Turki, Arab Saudi, Pakistan dan India.<sup>11</sup> Tanaman ini berfungsi sebagai anti-parasit, antifungi, antibakteri, antiviral, antioksidan, antineoplasma, antihipertensi dan anti-inflamasi.<sup>11-13</sup>

Fungsi antibakteri *N. sativa* dibuktikan melalui adanya penelitian yang melaporkan bahwa *N. sativa* memiliki efek antibakteri terhadap bakteri gram positif (*S. aureus*) maupun gram negatif (*Escherichia coli*) baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.<sup>11</sup> Kemudian penelitian yang lain menyatakan bahwa *N. sativa* dapat menghambat pertumbuhan koloni MRSA secara

*in vitro*.<sup>12,14,15</sup> Penelitian lain menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik sefadroksil dengan *N. sativa* dapat menurunkan jumlah bakteri patogen dan mengakibatkan kenaikan jumlah bakteri probiotik secara *in vivo* pada usus mencit.<sup>16</sup>

*N. sativa* juga berperan sebagai imunomodulator dan telah dibuktikan dengan penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pemberian ekstrak *N. sativa* meningkatkan fungsi sel *Natural Killer* (NK) dan fagositosis makrofag. Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak maupun minyak *N. sativa* meningkatkan proliferasi sel limfosit T (sel T) tetapi menghambat proliferasi sel limfosit B (sel B). Selain itu, produksi sitokin juga dipengaruhi oleh pemberian *N. sativa*. Beberapa sitokin yang dipengaruhi oleh *N. sativa* adalah Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin -6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin (IL-10) dan Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).<sup>17</sup>

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, telah diteliti pengaruh pemberian *N. sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson terhadap pertumbuhan koloni MRSA secara *in vivo*. Kombinasi seftriakson - minyak *N. sativa* diharapkan dapat bersifat adiktif maupun sinergis. Dosis minyak *N. sativa* yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,3 ml/hari, diambil dari penelitian sebelumnya yang mencari efek imunomodulator *N. sativa* pada mencit.<sup>18</sup> Penelitian dilakukan pada mencit BALB/c dan parameter yang akan dilihat adalah jumlah kuman MRSA pada kultur limpa mencit yang diterminasi. Jumlah kuman MRSA pada kultur limpa diambil sebagai parameter karena MRSA menyebar ke berbagai organ tubuh secara hematogen dan limpa merupakan satu-satunya organ yang terlibat dalam filtrasi darah sehingga limpa merupakan organ penting pada sistem pertahanan tubuh terhadap antigen yang beredar dalam darah, terutama dalam melawan infeksi bakteri dan jamur.<sup>19,20</sup>

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dengan menggunakan desain *post test only control group design*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei - Juni 2015 di Laboratorium Parasitologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Objek yang digunakan dalam penelitian adalah mencit BALB/c yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak drop out. Penelitian dilakukan dengan menganalisis hasil pengamatan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Mencit diadaptasi selama 7 hari, kemudian dibagi dalam 4 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol menggunakan metode randomisasi sederhana. Semua kelompok diberi injeksi kuman MRSA ATCC 43300 dengan dosis 0,2 ml ( $10^7$  cfu/ml) secara intraperitoneal.<sup>21</sup> Terdapat tiga perlakuan yaitu dengan pemberian seftriakson 0,03 ml secara intraperitoneal (P1), minyak *N. Sativa* 0,3 ml secara per oral (P2) dan kombinasi minyak *N. Sativa* 0,3 ml secara per oral - seftriakson 0,03 ml secara intraperitoneal (P3). Kelompok kontrol diberi aqua bidest secara intraperitoneal 0,03 ml sebagai pembanding.<sup>6,18,21</sup> Kuman dihitung menggunakan metode *plate count* dengan cara *streak plate* dalam cfu/ml jaringan.<sup>22</sup>

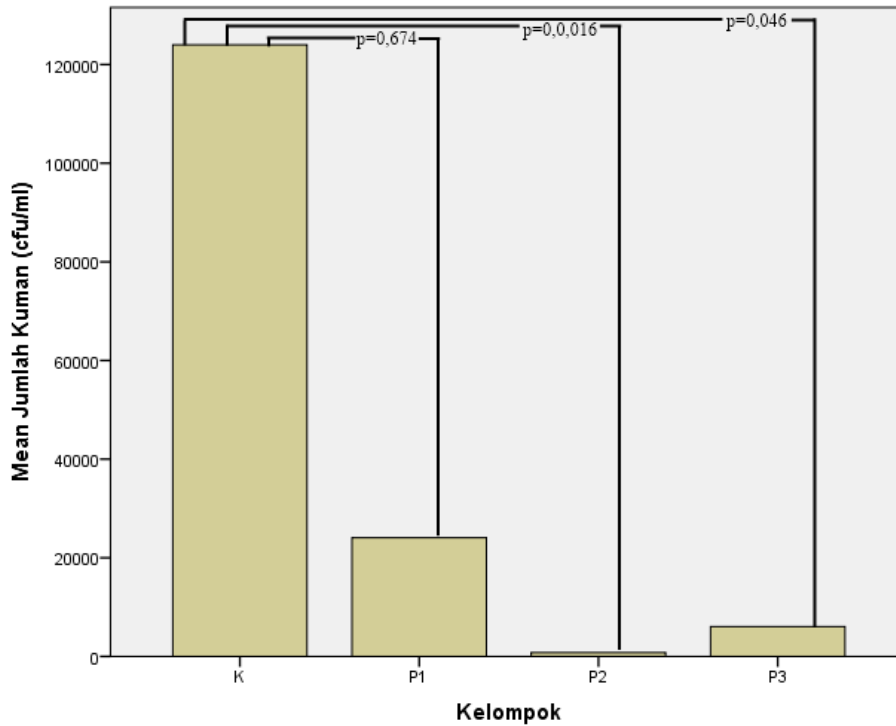
## HASIL

**Tabel 1.** Rerata Jumlah Kuman pada Kultur Limpa

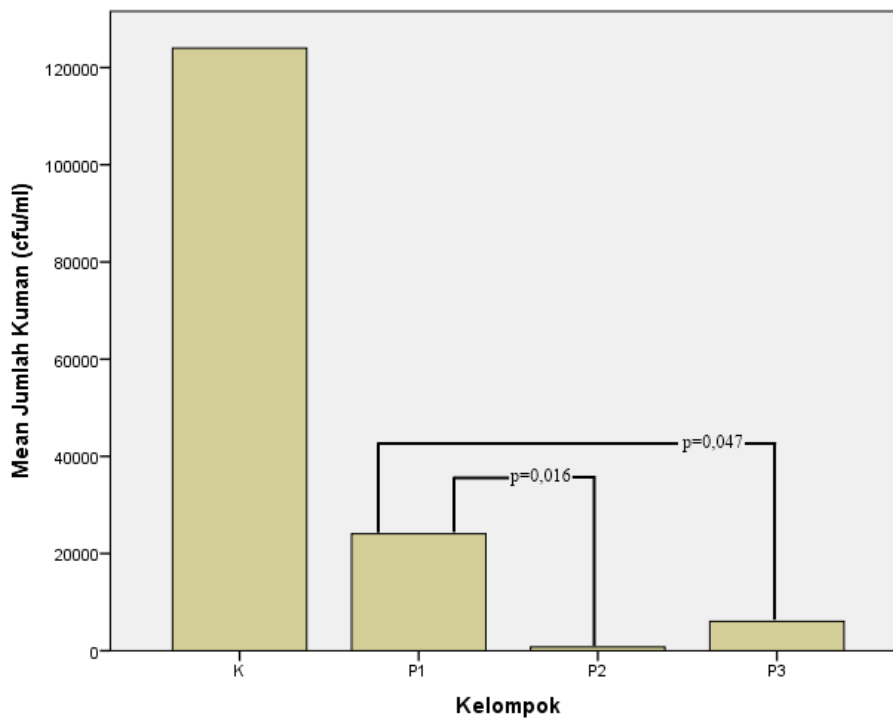
<b>Kelompok</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD (<math>\times 10^3</math> cfu/ml)</b>
<b>K</b>	124,00 $\pm$ 160,70
<b>P1</b>	24,08 $\pm$ 26,53
<b>P2</b>	0,78 $\pm$ 15,22
<b>P3</b>	6,05 $\pm$ 13,38

Tabel 1 menunjukkan nilai rerata jumlah kuman hasil kultur limpa pada masing-masing kelompok. Nilai rerata pada kelompok P1, P2 dan P3 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok P2 memiliki rerata jumlah kuman terendah yaitu 0,78 x  $10^3$  cfu/ml.

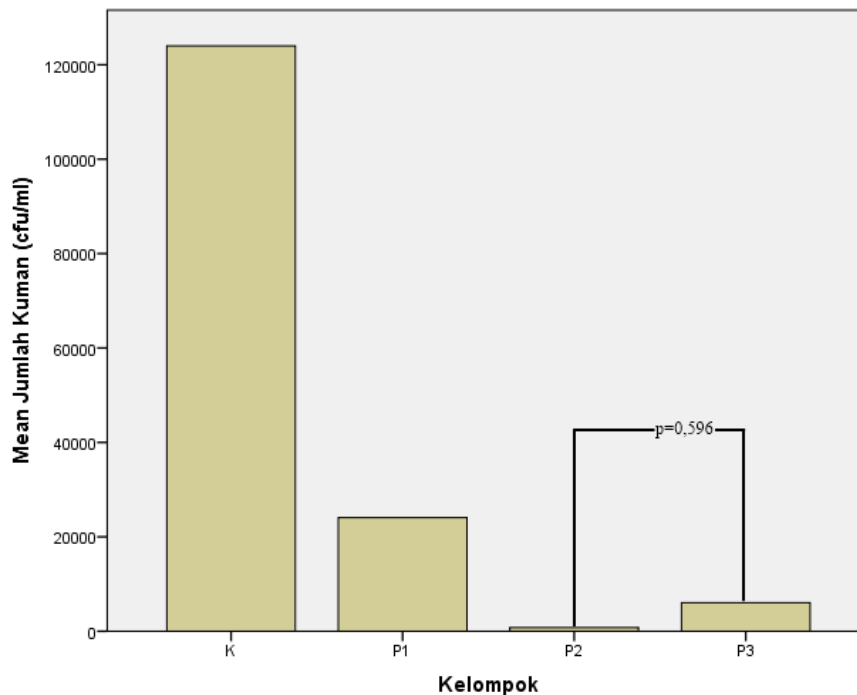
Hasil yang didapatkan pada uji *Saphiro-Wilk* adalah distribusi data tidak normal sehingga akan dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil dari uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* didapatkan  $p=0,017$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada jumlah kuman MRSA untuk semua kelompok. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok P2 ( $p=0,016$ ) dan P3 ( $p=0,046$ ), kelompok P1 dengan P2 ( $p=0,016$ ) dan P3 ( $p=0,047$ ). Perbedaan tidak bermakna ditemukan antara kelompok kontrol dengan P1 ( $p=0,674$ ) dan kelompok P2 dengan P3 ( $p=0,596$ ).



**Gambar 1.** Grafik hasil Uji *Mann-Whitney* antara kelompok kontrol dengan P1,P2, dan P3



**Gambar 2.** Grafik hasil Uji *Mann-Whitney* antara kelompok P1 dengan P2 dan P3



**Gambar 3.** Grafik hasil Uji *Mann-Whitney* antara kelompok P2 dengan P3

## PEMBAHASAN

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah perbedaan bermakna antara jumlah kuman pada kultur limpa mencit kelompok kontrol dengan P2 dan P3. Perbedaan bermakna juga didapati antara kelompok P1 dengan P2 dan P3. Penelitian terdahulu juga melaporkan bahwa minyak *N. sativa* dapat menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro* sekalipun diencerkan hingga konsentrasi 1%.<sup>12</sup> Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa daya antibakteri *N. sativa* lebih baik dibandingkan seftriakson. Penelitian lain menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi kemampuan untuk menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.<sup>13</sup> Penelitian yang menggunakan *N. Sativa* secara *in vivo* terhadap MRSA memang belum ada, namun jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Hosseinzadeh dkk, hasilnya hampir sama yaitu *N. sativa* menghambat pertumbuhan *S. aureus* secara *in vivo*.<sup>10</sup>

Penurunan jumlah kuman MRSA pada kelompok P2 dan P3 juga bisa disebabkan oleh *N. sativa* yang memacu sistem imunitas mencit selama masa terapi 8 jam. *N. sativa* dapat memacu aktivitas fagositosis makrofag. *Thymoquinone* pada *N. sativa* juga dapat

meningkatkan maturasi dan pelepasan sitokin.<sup>29</sup> Kandungan protein maupun ekstrak secara keseluruhan berpengaruh terhadap produksi TNF- $\alpha$ . Penelitian yang lain melaporkan bahwa terapi minyak *N. sativa* meningkatkan kadar serum IFN- $\gamma$ , yaitu sitokin yang diproduksi oleh Th1.<sup>13,23</sup> *N. sativa* juga berpengaruh terhadap IL-10 yang berhubungan dengan sel T regulator.<sup>23</sup> Kandungan melanin dapat berpengaruh terhadap meningkatnya TNF- $\alpha$ , IL-6 dan VEGF oleh sel monosit.<sup>24</sup>

Hasil hitung jumlah kuman pada kultur limpa kelompok P2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna dan rata-rata lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok P3. Hal ini menunjukkan tidak adanya sinergisme antara seftriakson dengan minyak *N. sativa*. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik dengan timokuinon maupun timohidrokuinon memiliki efek antimikroba yang sinergis terhadap isolat *S. aureus* secara *in vitro*. *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian tersebut diketahui sudah resisten terhadap antibiotik yang diujicobakan, yaitu ampicilin, sefaleksin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, sulfametoksazol dan siprofloksasin.<sup>25</sup> Penelitian lain menyebutkan bahwa kombinasi antibiotik sefadroksil dengan *N. sativa* dapat menurunkan jumlah bakteri patogen dan mengakibatkan kenaikan jumlah bakteri probiotik secara *in vivo* pada usus mencit.<sup>15</sup>

## KESIMPULAN DAN SARAN

Pemberian minyak *N. sativa* dan kombinasinya dengan seftriakson dapat menurunkan jumlah kuman MRSA pada kultur limpa mencit BALB/c. Perlu penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis pada setiap kelompok untuk mengetahui dosis kombinasi antibiotik dengan minyak *N. sativa* secara tepat untuk mendapatkan penurunan jumlah kuman MRSA paling efektif dan dosis maksimal yang dapat menyebabkan toksisitas. Perlu penelitian lebih lanjut untuk membandingkan minyak *N. sativa* dengan antibiotik yang sensitif pada infeksi MRSA. Penelitian lebih lanjut juga diperlukan untuk mengetahui komponen sistem imunitas yang berperan pada infeksi MRSA pada mencit.



**DAFTAR PUSTAKA**

1. Ray P, Gautam V, Singh R, editors. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in developing countries: implications and solutions. Regional Health Forum; 2011.
2. Yuwono. Staphylococcus aureus dan Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) [Disertasi]. Palembang: Departemen Mikrobiologi FK Unsri; 2012.
3. Arslan, Ferhat, et al. Splenic abscess caused by MRSA developing in an infarcted area : case report and literature review. *Journal of infection and Chemoterapy*. 2011; 17 (6): 851-54.
4. Organization WH. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance World Health Organization; 2014.
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. Katzung, Bertram G. *Farmakologi Dasar dan Klinik (Basic and Clinical Pharmacology)*. Edisi 10. Jakarta: EGC; 2012.
7. Satari MH, Wartadewi FGR. Sensitivity Test Cefoxitin (Second Generation of Cephalosporin) and Cefepime (Fourth Generation of Cephalosporin) Towards Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). 2013.
8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pealler MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* Vol. 1 Ed. 8th. Washington DC : ASM Press; 2003.
9. Yuwono. Pandemi Resistensi Antimikroba : Belajar dari MRSA. *JKK*. 2010; (42):2837–50.
10. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 26<sup>th</sup> ed. USA: McGraw-Hill; 2013.
11. Hosseinzadeh H, Bazzaz BF, Haghi MM. Antibacterial activity of total extracts and essential oil of *Nigella sativa* L. seeds in mice. *Pharmacolgyonline*. 2007;2:429-35.
12. 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
13. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB. *Molecular targets and therapeutic uses of spices: modern uses for ancient medicine*: World Scientific; 2009.

14. Clorinda FR. Uji Kemampuan Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember; 2012.
15. Amrullah A, Satari MH. Efektivitas Daya Antibakteri *Habatussaudah* terhadap *Staphylococcus aureus* Resisten Metisilin (MRSA). FKG Universitas Padjajaran; 2009.
16. Jamil, Ahmad Sobrun, et al. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji *Nigella sativa* terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik secara in vitro dan in vivo. *Pharmacy, Jurnal Farmasi Indonesia*. 2014;11 (02).
17. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*. 2005;5(13):1749-70.
18. Buyukoztruk, Suna, 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) : 295-98
19. Paul, William E. *Fundamental immunology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia : Wolter Kluwer Health; 2013.
20. Mescher, Anthony L. *Histologi Dasar Junqueira Teks & Atlas*. Edisi 12. Jakarta : EGC; 2012.
21. Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003; 52(6): 974-980.
22. Goldman E, Lorrence HG. *Practical Handbook of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. US: Taylor & Francis Group; 2009
23. Sufrida Y, Edi J. *Sembuhkan Penyakit dengan Habbatussauda*. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2006.
24. Kouidhi, B., Zmantar, T., Jrah, H., Souiden, Y., Chaieb, K., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. Antibacterial and resistance-modifying activities of thymoquinone against oral pathogens. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2011; 10, 29
25. 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): 148-152