

# Evaluasi Rekayasa Ekstraksi Biji, Minyak, dan Limbah Habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap Komponen Bioaktif dan Kemampuan Penghambatan Bakteri

Evaluation of the Extraction Process of Seeds, Oil, and Waste of Black Seed (*Nigella sativa*) on Bioactive Compound and Bacterial Inhibition Ability

N N Barkah<sup>1\*</sup>, I K G Wiryawan<sup>1</sup>, Y Retnani<sup>1</sup>, I W T Wibawan<sup>2</sup>, E Wina<sup>3</sup>

Corresponding email:

nisanurmilati@apps.ipb.ac.id,

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, IPB University, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

<sup>3</sup>Badan Riset dan Inovasi Nasional, Ciawi, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

## ABSTRACT

The content of active compounds in natural materials is generally low and highly variable, thus requiring efficient and selective extraction methods. This study aims to evaluate a stepwise extraction process applied to the seeds, oil, and by-products of *Nigella sativa* (black cumin) to obtain thymoquinone (TQ) and other phytochemicals. The study consisted of four main stages: (1) extraction of HS oil using the cold press method, (2) stepwise extraction using 70% ethanol as solvent, (3) analysis of TQ content and phytochemical compounds in the extracts, and (4) evaluation of the antibacterial activity of habbatussauda oil extracts against pathogenic and non-pathogenic bacteria. Results showed that the cold press method yielded 34.46% oil. Stepwise extraction using 70% ethanol resulted in significant differences ( $p < 0.05$ ) in both yield and TQ content among the seed, oil, and by-product extracts. Among all samples, the ethanol extract from habbatussauda oil exhibited the highest yield and TQ concentration. Furthermore, at a concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , this extract inhibited the growth of pathogenic bacteria such as *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, without affecting non-pathogenic strains like *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacteria* spp. In conclusion, stepwise extraction using 70% ethanol proved effective in enhancing TQ recovery and demonstrated potential as a phytobiotic agent with selective antibacterial activity against pathogenic bacteria.

**Key words:** black seed, phytobiotic, phytochemicals, stepwise extraction, thymoquinone

## ABSTRAK

Kandungan senyawa aktif dalam bahan alami umumnya rendah dan bervariasi, sehingga diperlukan metode ekstraksi yang efisien dan selektif. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi proses ekstraksi bertingkat terhadap biji, minyak, dan limbah *Nigella sativa* (habbatussauda) dalam memperoleh senyawa thymoquinone (TQ) dan fitokimia lainnya. Penelitian terdiri atas empat tahap, yaitu: (1) ekstraksi minyak habbatussauda menggunakan metode *cold press*, (2) ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut etanol 70%, (3) analisis kandungan TQ dan senyawa fitokimia dalam ekstrak, serta (4) evaluasi aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dan non-patogen. Hasil menunjukkan bahwa metode *cold press* menghasilkan rendemen minyak sebesar 34,46%. Ekstraksi bertingkat dengan etanol 70% menghasilkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) dalam rendemen dan kandungan TQ antara ekstrak biji, minyak, dan limbah habbatussauda. Ekstrak minyak habbatussauda yang diekstraksi dengan etanol 70% menunjukkan rendemen dan kadar TQ tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Selain itu, pada konsentrasi  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ekstrak tersebut mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli* tanpa memengaruhi populasi *Lactobacillus* spp. dan *Bifidobacteria* spp. Simpulan penelitian menunjukkan ekstraksi bertingkat menggunakan etanol 70% terbukti efektif dalam meningkatkan perolehan senyawa TQ serta menunjukkan potensi sebagai agen fitobiotik selektif terhadap bakteri patogen.

**Kata kunci:** ekstraksi bertingkat, fitobiotik, fitokimia, habbatussauda, thymoquinone



Copyright © 2024 by JINTP

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## PENDAHULUAN

Kandungan senyawa aktif dalam bahan baku alami umumnya rendah serta bervariasi, sehingga proses ekstraksi dan isolasinya memerlukan waktu yang cukup lama. Kondisi ini mendorong perlunya pengembangan metode ekstraksi dan isolasi yang lebih efektif dan selektif untuk memperoleh senyawa aktif dari bahan alam. Ekstraksi merupakan tahap awal dalam pemisahan senyawa aktif yang diinginkan dari bahan baku. Beberapa metode yang digunakan dalam proses ini meliputi ekstraksi mekanik dengan teknik penekanan (*pressing*), ekstraksi menggunakan pelarut (*solvent extraction*), distilasi, dan sublimasi.

Metode ekstraksi mekanik melalui *pressing* umumnya didefinisikan sebagai teknik pemisahan dua fase (padat-cair) yang digunakan dalam ekstraksi minyak dari biji dengan kadar minyak di bawah 20% (Zuorro et al. 2014). Dalam metode ini, tekanan dimanfaatkan untuk memisahkan kedua fase tersebut. Salah satu pendekatan mekanik yang umum digunakan adalah metode *cold press*, yakni proses ekstraksi tanpa pemanasan, yang berlangsung pada suhu antara 28–35 °C. Mesin *cold press* memiliki satu saluran masuk untuk bahan baku dan dua saluran keluar untuk hasil ekstraksi berupa minyak dan residu padat (*cake*).

Di sisi lain, ekstraksi pelarut merupakan metode yang paling banyak digunakan. Menurut Zhang et al. (2018), proses ekstraksi dari bahan alam menggunakan pelarut terdiri atas beberapa tahap: (1) penetrasi pelarut ke dalam matriks padat, (2) pelarutan senyawa terlarut dalam pelarut, (3) difusi senyawa dari matriks ke pelarut, dan (4) pengumpulan senyawa terlarut. Efisiensi dari proses ini dipengaruhi oleh berbagai faktor yang memengaruhi difusivitas dan kelarutan, seperti sifat pelarut, ukuran partikel bahan, rasio pelarut terhadap bahan, suhu, dan waktu ekstraksi (Li et al. 2014; Yi et al. 2012; Zhou et al. 2012).

Perkembangan metode ekstraksi minyak Habbatussauda telah mengalami kemajuan signifikan dalam beberapa tahun terakhir. Metode *cold press* tetap menjadi pilihan utama karena kesederhanaannya dan sifat ramah lingkungan, meskipun menghasilkan rendemen minyak yang lebih rendah dibandingkan metode lain seperti ekstraksi pelarut atau *supercritical CO<sub>2</sub>* (SFE). Namun, penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi menggunakan etanol 70% selama empat jam dapat meningkatkan kandungan *thymoquinone* (TQ) secara signifikan (Urbanova et al. 2020). Selain itu, pendekatan ekstraksi dua tahap juga telah terbukti meningkatkan produksi minyak habbatussauda hingga 23,55% dibandingkan metode ekstraksi Tunggal (Ma et al. 2019). Selain itu, teknik ekstraksi seperti ultrasonik dan perkolasi juga telah dieksplorasi untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi dan kandungan TQ pada habbatussauda (Mohammed et al. 2016). Dengan berbagai metode ekstraksi yang tersedia, penting untuk memilih metode paling sesuai dengan tujuan dan kebutuhan spesifik, baik dari segi efisiensi, kualitas,

maupun dampak lingkungan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi proses ekstraksi bertingkat terhadap biji, minyak, dan limbah *Nigella sativa* (habbatussauda) dalam memperoleh senyawa thymoquinone (TQ) dan fitokimia lainnya.

## METODE

### Bahan dan Alat yang Digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji habbatussauda diperoleh dari distributor herbal di Surabaya, Jawa Timur, etanol 70%, aquades, dan kertas saring. Adapun peralatan yang digunakan adalah mesin *press* (tipe SG30-1), *orbital shaker*, labu separator, *rotary evaporator*, dan *gas chromatography mass spectrophotometry* (GC-MS),

### Prosedur Penelitian

#### Ekstraksi minyak habbatussauda dengan metode *cold press*

Ekstraksi minyak Habbatussauda menggunakan metode *cold press* dilakukan dengan memasukkan biji habbatussauda utuh dengan bobot yang diketahui ke dalam mesin *press* (tipe SG30-1). Suhu dijaga pada kisaran 28-35 °C. Proses ekstraksi ini diamati dengan 5 kali ulangan untuk mengetahui rata-rata dan standar deviasi dari waktu dan rendemen proses ekstraksi. Waktu ekstraksi dicatat. Minyak hasil ekstraksi ditampung untuk dihitung rendemen ekstrak tahap pertama. Setelah itu, minyak mengalami ekstraksi tahap kedua menggunakan pelarut etanol 70%.

#### Ekstraksi bertingkat minyak habbatussauda

Minyak yang dihasilkan dari metode *cold press* dicampur dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:1 v/v. Campuran dikocok dalam botol kaca menggunakan *orbital shaker* selama 4 jam (Urbanova et al. 2020). Setelah proses ini, sampel didiamkan selama 12 jam, kemudian fase minyak dan fase hidroalkohol dipisahkan menggunakan labu separator. Fase hidroalkohol yang kaya TQ ini kemudian diuapkan etanolnya menggunakan alat *rotary evaporator*. Ekstrak kaya TQ ini kemudian dihitung rendemennya, dianalisis kandungan TQ, dan senyawa fitokimianya menggunakan *gas chromatography mass spectrophotometry* (GC-MS).

#### Ekstraksi biji dan limbah habbatussauda dengan sonikator

Sebagai perbandingan, dilakukan juga ekstraksi minyak dari biji dan limbah habbatussauda menggunakan alat sonikator. Ekstraksi dengan sonikator dilakukan selama 1 jam dengan perbandingan pelarut dan sampel adalah 20:1 mL g<sup>-1</sup> pada suhu 32 °C dengan ukuran partikel <0,5 mm (Abdullah & Koc 2012). Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 70%. Setelah mengalami sonikasi selama 1 jam, padatan dipisahkan menggunakan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan kemudian diambil untuk dianalisis kandungan TQ di dalamnya.

**Oil yield**

Minyak yang dihasilkan dalam setiap tahap ekstraksi ditampung dan kemudian dihitung volume atau bobotnya untuk mengetahui jumlah minyak yang diproduksi menggunakan metode *cold press*.

**Hasil ekstrak pekat**

Rendemen atau tingkat ekstraksi habbatussauda dihitung berdasarkan bobot ekstrak yang dihasilkan (setelah seluruh pelarut etanol diuapkan) dibandingkan dengan bobot biji habbatussauda yang digunakan untuk ekstraksi (dalam bahan kering).

Perhitungan rendemen sebagai berikut:

$$\text{Hasil ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak setelah evaporasi (g)}}{\text{bobot sampel (g)}}$$

**Analisis senyawa thymoquinone (modifikasi metode Al Saleh et al. 2006)**

Ekstrak biji, minyak, limbah habbatussauda dianalisis kandungan TQ nya menggunakan HPLC. Sampel ekstrak diinjeksi ke dalam sistem HPLC sebanyak 20 µL. Analisis TQ terdeteksi dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm pada suhu kamar. Laju aliran 1,5 mL menit<sup>-1</sup> digunakan dan identifikasi dikonfirmasi melalui perbandingan waktu, senyawa standar dipertahankan dengan sampel minyak dan perhitungan kuantitas dicapai dengan membuat kurva kalibrasi linier standar. Adapun sampel ekstrak hanya dilarutkan saja dengan metanol, kemudian disaring dengan saringan nylon 0,45 µm lalu diinjeksi ke dalam sistem HPLC. Perhitungan kandungan thymoquinone:

$$\text{TQ} = \left( \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \right) \times \text{konsentrasi standar} \times \frac{\text{volume labu} \times \text{faktor pengencer}}{\text{volume yang diambil}}$$

**Analisis senyawa fitokimia pada ekstrak biji, minyak, dan limbah habbatussauda (*Nigella sativa*)**

Analisis GC-MS dari ekstrak biji, minyak, dan limbah habbatussauda (masing-masing 1 sampel) dibuat dalam instrumen Agilent 7890 A. Sebanyak 1 µL ekstrak etanol disuntikkan ke dalam GC-MS menggunakan jarum suntik mikro dan pemindaian dilakukan selama 45 menit. Sebelum menganalisis ekstrak menggunakan GC-MS, suhu oven, laju aliran gas yang digunakan dan pistol elektron diprogram terlebih dahulu. Suhu oven dipertahankan pada 100°C. Gas helium digunakan sebagai pembawa sekaligus eluen. Laju aliran helium diatur pada 1 mL menit<sup>-1</sup>. Kolom yang digunakan di sini untuk pemisahan komponen adalah Elite 1 (100% dimetil poli siloksan). Identitas komponen dalam ekstrak ditentukan oleh perbandingan indeks retensi dan pola fragmentasi spektrum massa dengan yang disimpan di perpustakaan komputer dan juga dengan literatur yang diterbitkan. Senyawa diidentifikasi dengan membandingkan spektrumnya dengan spektrum perpustakaan spektral massa Wiley dan NIST/EPA/NIH (Kareem et al. 2015; Imad et al. 2014).

**Rancangan penelitian ekstraksi biji, minyak, dan limbah habbatussauda (*nigella sativa*)**

Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan dan 4 ulangan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diberikan sebagai berikut:

B : Biji habbatussauda diekstraksi dengan sonikator dan etanol 70%

M : Minyak habbatussauda diekstraksi dengan mesin *press* dan etanol 70%

L : Limbah habbatussauda diekstraksi dengan sonikator dan etanol 70%

**Persiapan sampel ekstrak minyak habbatussauda (*Nigella sativa*)**

Minyak Habbatussauda yang diperoleh dengan metode *cold press* dicampur dengan etanol 70% dengan perbandingan 1:1 v/v. Campuran dikocok dalam botol kaca menggunakan *orbital shaker* selama 4 jam (sesuai hasil penelitian Urbanova et al. 2020). Setelah proses ini, sampel didiamkan selama 12 jam, kemudian fase minyak dan fase hidroalkohol dipisahkan menggunakan labu separator. Fase hidroalkohol yang kaya thymoquinone ini kemudian diuapkan etanolnya menggunakan alat *rotary vacuum evaporator*.

**Evaluasi ekstrak minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap penghambatan bakteri**

Analisis *minimum inhibitory concentration* (MIC) dari ekstrak minyak Habbatussauda yang telah diuapkan etanolnya dilakukan menggunakan metode microplate (Eloff 1998) dengan level ekstrak 0-1000 µg mL<sup>-1</sup>. Perbedaan level ekstrak dilakukan dengan mengatur konsentrasinya dalam media uji yang digunakan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Bakteri yang digunakan adalah bakteri patogen (*E. coli* dan *S. typhimurium*) dan bakteri non patogen (*Lactobacillus* sp dan *Bifidobacteria* sp). Bakteri *E. coli* ditumbuhkan pada media BHI, sedangkan bakteri *S. typhimurium*, *Lactobacillus* sp dan *Bifidobacteria* sp ditumbuhkan pada media MRS. Analisis MIC dilakukan setelah 24 jam inkubasi. Pertumbuhan bakteri diamati dari nilai *optical density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm.

**Rancangan penelitian analisis MIC ekstrak minyak habbatussauda (*Nigella sativa*)**

Penelitian ini terdiri dari 11 perlakuan dengan level TQ berbeda (0 hingga 1000 µg mL<sup>-1</sup>) dan 3 ulangan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

**Analisis Data**

Seluruh data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA (*Analysis of variance*) menggunakan IBM SPSS Statistics 23. Jika terdapat perbedaan signifikan dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan (Steel & Torrie 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Minyak Habbatussauda (*Nigella sativa*) dengan Metode Cold Press

Metode *cold press* merupakan teknik ekstraksi yang dilakukan tanpa pemanasan eksternal dan tanpa penggunaan pelarut kimia. Dalam penelitian ini, ekstraksi minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) dengan metode *cold press* menunjukkan hasil yang cukup menjanjikan, baik dari segi efisiensi maupun kualitas ekstrak yang dihasilkan. Tabel 1 menunjukkan bahwa proses ekstraksi dilakukan dalam rentang suhu 31–38 °C dengan waktu proses rata-rata 22,83±2,21 menit. Suhu ini tergolong rendah dan masih sesuai dengan kriteria metode *cold press*, yaitu di bawah 40°C, yang bertujuan untuk menjaga stabilitas senyawa bioaktif seperti thymoquinone, flavonoid, dan asam lemak esensial yang sensitif terhadap panas. *Oil yield* Habbatussauda yang dihasilkan dengan metode *cold press* sebesar 34,46% ± 1,12% menunjukkan efisiensi yang cukup tinggi untuk metode mekanis tanpa pelarut. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Zuorro *et al.* (2014), yang melaporkan *oil yield* di bawah 20% untuk ekstraksi minyak nabati menggunakan metode mekanis. Hal ini mengindikasikan bahwa masih terdapat fraksi minyak yang tertinggal dalam limbah padat setelah ekstraksi.

Limbah kering yang dihasilkan sebesar 62,87% ± 2,72% mendukung temuan tersebut, karena mengindikasikan bahwa sebagian besar massa padatan tetap tidak terdegradasi selama proses ekstraksi. Proses ekstraksi satu tahap tanpa pemanasan dan tanpa perlakuan pra-ekstraksi seperti perendaman atau pelunakan jaringan biji menyebabkan minyak sulit keluar sepenuhnya dari struktur sel biji. Sebagian besar minyak pada biji tanaman tidak dapat diekstrak secara maksimal tanpa bantuan perlakuan panas atau tekanan tinggi. Selain itu, penggunaan sampel dalam jumlah kecil (sekitar 500 g) tanpa adanya tekanan eksternal tambahan menyebabkan kerja mekanis mesin menjadi kurang optimal. Faktor ini turut mempengaruhi jumlah minyak yang diekstraksi. Dalam skala industri, proses *cold press* biasanya dilakukan dalam dua tahap ekstraksi atau dikombinasikan dengan proses pemurnian lanjutan guna meningkatkan efisiensi perolehan minyak. Meskipun demikian, metode *cold press* memiliki keunggulan dari sisi kualitas minyak. Tidak adanya proses pemanasan yang signifikan maupun penggunaan pelarut kimia menjadikan minyak yang dihasilkan lebih murni, tidak terkontaminasi, serta memiliki kandungan senyawa bioaktif yang lebih tinggi (Siddique *et al.* 2020). Mohammed *et al.* (2016) membahas perbandingan antara metode *supercritical fluid extraction* (SFE) dan *cold press* dalam ekstraksi minyak HS. Penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun metode SFE menghasilkan kadar thymoquinone yang lebih tinggi, namun metode *cold press* tetap menghasilkan minyak dengan kualitas baik dan lebih disukai karena tidak menggunakan pelarut kimia dan menjaga kestabilan

**Tabel 1** Proses ekstraksi minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) dengan metode *cold press*

Peubah	Hasil
Suhu (°C)	31 - 38
Waktu (menit)	22,83±2,21
Limbah kering (%)	62,87±2,72
<i>Oil yield</i> (%)	34,46±1,12

senyawa bioaktif pada suhu rendah. Oleh karena itu, metode ini sangat sesuai untuk produksi minyak fungsional atau minyak obat yang membutuhkan kualitas tinggi, meskipun dari sisi kuantitas perolehan minyak masih perlu ditingkatkan.

### Hasil Ekstrak Pekat dan Kandungan Senyawa Thymoquinone pada Ekstrak Etanol dari Biji, Minyak, dan Limbah Habbatussauda (*Nigella sativa*)

Hasil ekstraksi pekat dari tiga jenis bahan biji, minyak, dan limbah habbatussauda (*Nigella sativa*) menggunakan etanol 70% menunjukkan adanya variasi signifikan antar perlakuan (Tabel 2). Ekstraksi menggunakan metode ultrasonik diterapkan pada bahan padat (biji dan limbah), sedangkan metode maserasi digunakan pada minyak habbatussauda. Pemilihan metode ini disesuaikan dengan karakteristik fasa sampel yang berbeda, di mana bahan padat memerlukan disrupti struktur jaringan untuk melepaskan senyawa aktif, sedangkan minyak sebagai fasa cair memungkinkan difusi senyawa larut ke dalam pelarut tanpa perlakuan fisik tambahan. Hasil ekstrak pekat tertinggi diperoleh dari biji habbatussauda, yaitu sebesar 4,27± 0,31 mL g<sup>-1</sup>, yang secara statistik tidak berbeda nyata dengan hasil ekstrak dari limbah padat (3,87±0,58 mL g<sup>-1</sup>) pada taraf signifikansi  $p < 0,05$ . Sementara itu, hasil ekstrak dari minyak habbatussauda menunjukkan nilai yang paling rendah, yaitu 0,70±0,02 mL mL<sup>-1</sup>, dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dua perlakuan lainnya. Rendahnya hasil ekstrak pada minyak dapat dijelaskan oleh dua hal utama. Pertama, polaritas pelarut etanol 70% tidak ideal untuk mengekstraksi seluruh komponen dari fasa minyak, terutama senyawa non-polar seperti waxes, sterol, atau trigliserida, yang memiliki kelarutan rendah dalam pelarut semi-polar. Kedua, rasio pelarut terhadap sampel pada ekstraksi minyak adalah 1:1 (v/v), jauh lebih kecil dibandingkan rasio 20:1 (v/b) yang digunakan pada ekstraksi biji dan limbah, sehingga jumlah senyawa yang berhasil diekstraksi relatif lebih sedikit.

Perbedaan hasil ekstrak antara biji dan limbah habbatussauda mengindikasikan bahwa sebagian besar senyawa bioaktif tetap tersisa dalam limbah setelah proses *cold press*. Hal ini sejalan dengan hasil sebelumnya (Tabel 1), di mana *oil yield* hanya mencapai 34,46%, yang berarti fraksi padat limbah masih mengandung senyawa larut etanol, termasuk thymoquinone dan komponen fenolik lain. Ekstraksi ultrasonik berperan penting dalam meningkatkan efisiensi pelepasan senyawa aktif dari bahan padat melalui mekanisme kavitasi dan peningkatan transfer



**Tabel 2** Hasil ekstrak pekat pada ekstrak etanol dari biji, minyak, dan limbah habbatussauda (*Nigella sativa*)

Perlakuan	Hasil ekstrak pekat
Ekstrak Etanol 70% Biji	4,27±0,31 <sup>b</sup>
Habbatussauda (mL g <sup>-1</sup> )	
Ekstrak Etanol 70% Minyak	0,70±0,02 <sup>a</sup>
Habbatussauda (mL mL <sup>-1</sup> )	
Ekstrak Etanol 70% Limbah	3,87±0,58 <sup>b</sup>
Habbatussauda (mL g <sup>-1</sup> )	

Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,05)

massa (Chemat *et al.* 2017). Meskipun hasil ekstrak dari minyak lebih rendah secara kuantitatif, kualitas senyawa yang diperoleh dari ekstrak minyak umumnya lebih murni karena tidak tercampur dengan matriks padat seperti pada biji dan limbah. Oleh karena itu, meskipun volumenya kecil, ekstrak dari minyak dapat memiliki konsentrasi senyawa aktif tertentu yang lebih tinggi per satuan volume. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa baik biji maupun limbah habbatussauda masih merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang dapat diekstrak menggunakan pelarut polar-semi polar seperti etanol 70%. Limbah habbatussauda hasil *cold press* khususnya memiliki nilai tambah sebagai bahan baku sekunder dalam industri farmasi atau kosmetik dan juga bisa digunakan sebagai bahan baku pakan ternak.

Thymoquinone (TQ) merupakan senyawa bioaktif utama dalam habbatussauda (*Nigella sativa*) yang dikenal memiliki berbagai aktivitas farmakologis, termasuk antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. Hasil analisis kandungan thymoquinone dalam ekstrak etanol 70% dari tiga jenis bahan (biji, minyak, dan limbah Habbatussauda) menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan (p<0,05), sebagaimana ditampilkan pada Tabel 3. Kandungan thymoquinone tertinggi ditemukan pada ekstrak minyak habbatussauda, yaitu sebesar 2855,79 ± 170,48 µg mL<sup>-1</sup>, secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak dari biji (510,00±68,99 µg g<sup>-1</sup>) dan limbah (31,30 ± 3,38 µg g<sup>-1</sup>). Tingginya kandungan TQ pada ekstrak minyak ini dapat dijelaskan oleh dua faktor utama. Pertama, karena minyak habbatussauda secara alami merupakan fraksi yang lebih kaya akan senyawa lipofilik, termasuk TQ, sehingga pelarut semi-polar seperti etanol 70% lebih efisien mengekstrak TQ dari fasa minyak dibandingkan dari matriks padat. Kedua, minyak habbatussauda yang digunakan telah melalui proses ekstraksi bertingkat: tahap awal dengan metode *cold press* yang memisahkan fraksi minyak dari bahan padat, dan tahap lanjutan melalui maserasi dengan etanol. Proses bertingkat ini memungkinkan pemekatan senyawa bioaktif, termasuk TQ, sehingga menghasilkan konsentrasi yang lebih tinggi.

Sebaliknya, kandungan TQ pada ekstrak dari limbah habbatussauda menunjukkan nilai yang paling rendah. Hal ini dapat dipahami karena limbah merupakan residu

**Tabel 3** Kandungan senyawa thymoquinone pada ekstrak etanol dari biji, minyak, dan limbah habbatussauda (*Nigella sativa*)

Perlakuan	Kandungan thymoquinone
Ekstrak Etanol 70% Biji	510,00±68,99 <sup>b</sup>
Habbatussauda (mL g <sup>-1</sup> )	
Ekstrak Etanol 70% Minyak	2855,79±170,48 <sup>c</sup>
Habbatussauda (mL mL <sup>-1</sup> )	
Ekstrak Etanol 70% Limbah	31,30±3,38 <sup>a</sup>
Habbatussauda (mL g <sup>-1</sup> )	

Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,05)

dari proses *cold press*, yang telah mengurangi sebagian besar fraksi lipid, termasuk TQ. Meskipun ekstraksi dilakukan dengan metode ultrasonik yang dapat meningkatkan pelepasan senyawa aktif melalui efek kavitasi, kandungan awal TQ dalam limbah sudah sangat rendah, sehingga hasil akhir ekstraksinya juga rendah. Meski demikian, keberadaan TQ meskipun dalam jumlah kecil pada limbah menunjukkan bahwa residu hasil *cold press* masih memiliki potensi untuk dimanfaatkan lebih lanjut, terutama dalam formulasi produk berbasis bahan alam atau sebagai bahan tambahan dalam produk fungsional. Menariknya, kandungan TQ pada ekstrak biji tergolong sedang, yaitu sekitar 510 µg g<sup>-1</sup>, mencerminkan bahwa sebagian besar TQ masih tertahan dalam biji utuh sebelum proses *cold press*. Ini menunjukkan bahwa ekstraksi langsung dari biji dapat menjadi strategi alternatif untuk memperoleh TQ tanpa melalui isolasi minyak terlebih dahulu, meskipun efisiensi pelarut dan metode fisik seperti ultrasonik tetap menjadi penentu keberhasilan ekstraksi. Secara umum, hasil ini menegaskan bahwa kandungan thymoquinone sangat dipengaruhi oleh bentuk dan jenis bahan, serta metode ekstraksi yang digunakan. Pemilihan metode ekstraksi yang sesuai tidak hanya mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terekstraksi, tetapi juga kualitas ekstrak yang dihasilkan.

#### Identifikasi Senyawa Fitokimia pada Ekstrak Etanol 70% dari Biji Habbatussauda (*Nigella sativa*)

Analisis kromatogram GC-MS terhadap ekstrak etanol 70% dari biji habbatussauda (*Nigella sativa*) menunjukkan adanya sembilan senyawa utama yang terdeteksi, yang secara umum dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok besar, yaitu komponen *volatile oil* (minyak atsiri) dan komponen lemak (*fatty acids*) (Tabel 4). Keberadaan kedua kelompok senyawa tersebut mencerminkan spektrum fitokimia khas dari biji habbatussauda, yang kaya akan senyawa bioaktif lipofilik dan semi-polar. Kelompok senyawa *volatile oil* mencakup p-Cymene (13,82%), Trans-4-methoxy thujane (5,17%), Thymoquinone (12,47%), dan 1,4-Benzenediol atau hidrokuinon (1,24%). Di antara senyawa ini, thymoquinone merupakan senyawa bioaktif paling penting yang dikenal memiliki berbagai efek terapeutik seperti antiinflamasi, antioksidan, antikanker, dan hepatoprotektif (Ahmad *et al.* 2013).

**Tabel 4** Hasil analisis kromatogram GC-MS dari ekstrak etanol 70% biji habbatussauda (*Nigella sativa*)

Senyawa fitokimia	RT (min)	Area (%)
<i>Volatile oil</i>		
p-Cymene	9,672	13,819
Trans-4-methoxy thujane	13,590	5,173
Thymoquinone	19,437	12,469
1,4-Benzenediol (hidrokuinon)	20,376	1,237
<i>Lemak</i>		
Hexadecanoic acid	45,558	7,703
9,12-Octadecadienoic acid	51,020	27,011
9-Octadecenoic acid	51,306	11,156
Stearat	52,456	0,988
cis-11,14-Eicosadienoic acid	60,163	0,030

Nilai area yang cukup tinggi dari thymoquinone menunjukkan bahwa metode ekstraksi menggunakan etanol 70% cukup efisien untuk melarutkan senyawa ini dari biji Habbatussauda. Senyawa lain seperti p-cymene, yang juga berkontribusi terhadap aroma khas HS, merupakan senyawa terdeteksi dengan proporsi area tertinggi (13,82%). Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan sinergistik terhadap thymoquinone (Nickavar *et al.* 2003).

Kelompok kedua adalah senyawa lemak, terdiri dari asam lemak jenuh dan tak jenuh. Komponen utama dalam kelompok ini adalah 9,12-Octadecadienoic acid (asam linoleat) dengan proporsi area tertinggi sebesar 27,01%, diikuti oleh 9-Octadecenoic acid (asam oleat) sebesar 11,16%, dan Hexadecanoic acid (asam palmitat) sebesar 7,70%. Kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi, terutama asam linoleat dan oleat, memberikan kontribusi penting terhadap aktivitas biologis HS, termasuk sebagai antioksidan dan pelindung sistem kardiovaskular (Ali dan Blunden 2003). Kandungan ini juga menunjukkan bahwa meskipun proses ekstraksi menggunakan pelarut semi-polar seperti etanol, fraksi lipid masih dapat terlarut secara signifikan, terutama senyawa dengan polaritas menengah hingga rendah. Adapun senyawa minor seperti stearat (0,99%) dan cis-11,14-Eicosadienoic acid (0,03%) memiliki kontribusi kecil dalam total area, namun tetap penting untuk dicatat karena perannya dalam aktivitas biologis keseluruhan dari ekstrak. Stearat, meskipun merupakan asam lemak jenuh, diketahui memiliki efek netral terhadap profil lipid plasma, sedangkan eicosadienoic acid merupakan asam lemak tak jenuh ganda yang jarang dilaporkan dan masih terus diteliti potensi farmakologinya. Temuan ini menegaskan bahwa ekstrak etanol 70% dari biji habbatussauda tidak hanya mengandung thymoquinone, tetapi juga berbagai senyawa volatil dan lipid yang berkontribusi terhadap aktivitas bioaktif total dari ekstrak tersebut. Kombinasi senyawa volatile dan non-volatile ini mencerminkan potensi penggunaan ekstrak dalam aplikasi farmasi, kosmetik, dan pakan fungsional.

#### Identifikasi Senyawa Fitokimia pada Ekstrak Etanol 70% Minyak Habbatussauda (*Nigella sativa*)

Analisis GC-MS terhadap ekstrak etanol 70% dari minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) menghasilkan identifikasi delapan senyawa fitokimia utama, yang

dapat dikelompokkan ke dalam dua kategori besar, yaitu senyawa volatil (*volatile oil*) dan senyawa lemak (*fatty acids*), seperti ditampilkan pada Tabel 5. Komposisi senyawa ini merefleksikan profil kimia khas dari fraksi minyak Habbatussauda yang telah mengalami proses cold press dan kemudian diekstraksi ulang menggunakan etanol 70% melalui metode maserasi. Senyawa dominan dalam fraksi *volatile oil* adalah thymoquinone, dengan nilai area sebesar 39,92%, yang merupakan konsentrasi tertinggi di antara seluruh senyawa yang terdeteksi. Kandungan ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil GC-MS dari ekstrak etanol biji habbatussauda (Tabel 4), menegaskan bahwa fraksi minyak mengandung thymoquinone dalam jumlah yang lebih pekat. Hal ini didukung oleh fakta bahwa thymoquinone bersifat lipofilik dan lebih mudah larut serta terakumulasi dalam fraksi minyak dibandingkan dalam matriks padat seperti biji atau limbah. Kandungan tinggi thymoquinone pada ekstrak minyak menunjukkan keberhasilan metode ekstraksi bertingkat (*cold press* diikuti dengan maserasi etanol) dalam meningkatkan konsentrasi senyawa bioaktif utama ini. Temuan ini konsisten dengan hasil sebelumnya dari Ahmad *et al.* (2013), yang menyatakan bahwa thymoquinone merupakan komponen utama minyak *Nigella sativa* dan bertanggung jawab atas sebagian besar aktivitas biologisnya, termasuk antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker.

**Tabel 5** Hasil analisis kromatogram GC-MS dari ekstrak etanol 70% minyak habbatussauda (*Nigella sativa*)

Senyawa fitokimia	RT (min)	Area (%)
<i>Volatile oil</i>		
$\alpha$ -thujene	6,222	0,151
o-cymene	9,668	2,387
Terpinen-4-ol	16,359	1,041
<b>Thymoquinone</b>	<b>19,542</b>	<b>39,920</b>
3-Methyl-4-isopropylphenol	21,598	6,622
p-Cymene-2,5-diol	32,236	9,899
<i>Lemak</i>		
Hexadecanoic acid	45,546	0,410
8,11-Octadecadienoic acid	51,014	3,120

Selain thymoquinone, senyawa volatil lain yang teridentifikasi dengan area signifikan antara lain p-Cymene-2,5-diol (9,90%), 3-Methyl-4-isopropylphenol (6,62%), dan o-cymene (2,39%). Senyawa-senyawa ini memiliki aktivitas biologis tersendiri. p-Cymene-2,5-diol merupakan turunan fenolik yang bersifat antioksidan dan antimikroba, sementara 3-Methyl-4-isopropylphenol diketahui sebagai senyawa dengan aktivitas antiseptik. Keberadaan senyawa-senyawa ini memperkuat potensi bioaktivitas dari ekstrak minyak Habbatussauda tidak hanya dari sisi utama (thymoquinone), tetapi juga melalui efek sinergis dengan senyawa minor lainnya (Nickavar *et al.* 2003). Dalam kelompok senyawa lemak, dua komponen utama teridentifikasi, yaitu 8,11-Octadecadienoic acid (3,12%) dan Hexadecanoic acid (0,41%). Meskipun jumlahnya relatif kecil dibandingkan fraksi *volatile*, keberadaan asam lemak ini tetap signifikan karena berkontribusi terhadap sifat fungsional minyak, seperti kestabilan oksidatif dan efek metabolik. Asam 8,11-octadecadienoic merupakan asam lemak tak jenuh ganda, sementara hexadecanoic acid (asam palmitat) termasuk dalam kelompok asam lemak jenuh. Kedua senyawa ini juga ditemukan dalam ekstrak biji, namun dengan distribusi area yang berbeda, mengindikasikan perbedaan afinitas pelarut terhadap komponen-komponen tersebut bergantung pada bentuk matriks awal. Menariknya, dibandingkan dengan ekstrak biji (Tabel 4), ekstrak dari minyak HS menunjukkan jumlah puncak senyawa yang lebih sedikit, namun dengan konsentrasi relatif lebih tinggi untuk senyawa utama. Hal ini menggambarkan bahwa fraksi minyak mengandung komponen yang lebih selektif dan terkonsentrasi, khususnya senyawa lipofilik seperti thymoquinone dan turunannya. Ini menegaskan keunggulan ekstraksi berbasis pelarut terhadap fraksi minyak dalam memperoleh ekstrak bioaktif yang kaya kandungan utama, dengan senyawa pengganggu (*impurities*) yang lebih sedikit.

#### Identifikasi Senyawa Fitokimia pada Ekstrak Etanol 70% dari Limbah Habbatussauda (*Nigella sativa*)

Analisis GC-MS terhadap ekstrak etanol 70% dari limbah habbatussauda (*Nigella sativa*) menunjukkan bahwa meskipun limbah merupakan residu dari proses *cold press*, masih terdapat sejumlah senyawa bioaktif yang tersisa dalam jumlah signifikan (Tabel 6). Lima senyawa utama teridentifikasi, yang terdiri dari satu senyawa volatil (pyrazofurin) dan empat senyawa dari golongan lemak, termasuk derivat asam lemak tak jenuh seperti methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate dan conjugated linoleic acid (CLA). Adapun senyawa thymoquinone yang merupakan senyawa bioaktif utama dalam *Nigella sativa*, tidak terdeteksi secara signifikan dalam hasil GC-MS pada penelitian ini. Namun, hasil ini tidak sepenuhnya menegaskan keberadaan thymoquinone dalam limbah habbatussauda. Retnani *et al.* (2019) sebelumnya melaporkan bahwa limbah habbatussauda masih mengandung thymoquinone sebesar 0,015%. Nilai ini memang relatif sangat kecil dibandingkan kandungan TQ

**Tabel 6** Hasil analisis kromatogram GC-MS dari ekstrak etanol 70% limbah habbatussauda (*Nigella sativa*)

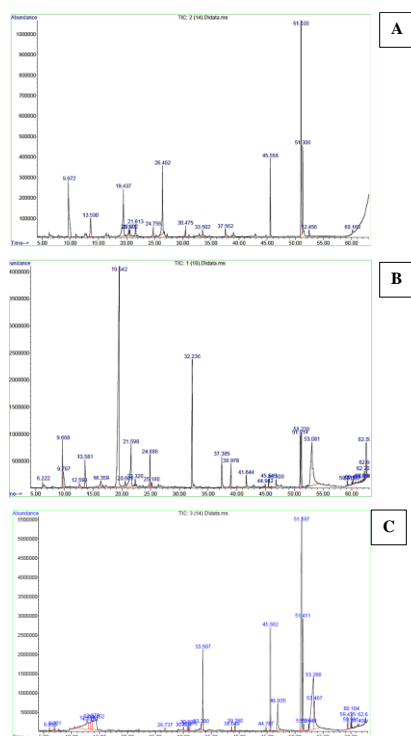
Senyawa fitokimia	RT (min)	Area (%)
<i>Volatile oil</i>		
Pyrazofurin	12,814	6,334
Lemak		
Glycerin	14,452	6,073
Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	51,197	28,380
9-Octadecadienoic acid	51,411	8,355
9(E),11(E)-Conjugated linoleic acid	53,288	18,527

pada ekstrak biji atau minyak habbatussauda (yang masing-masing dalam kisaran ratusan hingga ribuan  $\mu\text{g g}^{-1}$  atau  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , seperti terlihat pada Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian kecil TQ masih tertinggal dalam fraksi padat setelah proses *cold press*, meskipun sebagian besar telah terpisahkan ke dalam fraksi minyak.

Perbedaan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, proses *cold press* bersifat mekanis tanpa pelarut dan suhu tinggi, sehingga tidak seluruh minyak dan senyawa lipofilik terambil sempurna, memungkinkan adanya sisa TQ dalam limbah padat. Kedua, teknik dan sensitivitas deteksi pada GC-MS yang digunakan dalam penelitian ini mungkin tidak cukup untuk menangkap senyawa TQ dalam jumlah yang sangat rendah, atau senyawa tersebut telah mengalami degradasi atau transformasi menjadi turunan lain selama penyimpanan atau proses ekstraksi. Kehadiran senyawa volatil lain seperti pyrazofurin (6,33%) dalam limbah juga menunjukkan bahwa residu ini tetap memiliki potensi bioaktivitas, meskipun dari komponen kimia yang berbeda dengan fraksi minyak. Selain itu, deteksi methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate (28,38%) dan 9(E),11(E)-conjugated linoleic acid (18,53%) menunjukkan bahwa limbah masih mengandung fraksi lipid bioaktif, khususnya CLA, yang diketahui memiliki manfaat fisiologis seperti menurunkan risiko kanker, memperbaiki metabolisme lipid, serta aktivitas imunomodulator.

#### Evaluasi Penghambatan Ekstrak Minyak Habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap Penghambatan Bakteri

Evaluasi aktivitas antibakteri dari ekstrak minyak *Nigella sativa* (habbatussauda) yang mengandung berbagai level thymoquinone (TQ) menunjukkan efek penghambatan yang signifikan terhadap dua bakteri patogen, yakni *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*, sebagaimana ditampilkan pada Tabel 7. Sebaliknya, pengaruh ekstrak terhadap dua bakteri menguntungkan, yaitu *Lactobacillus* sp. dan *Bifidobacteria* sp. bersifat jauh lebih moderat dan bergantung pada konsentrasi TQ. Secara umum, penurunan tajam populasi *E. coli* dan *S. typhimurium* mulai terlihat sejak konsentrasi TQ mencapai  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Pada level ini, populasi *E. coli* menurun dari  $17,74$



**Gambar 1** Kromatogram GC-MS dari ekstrak etanol 70% (A) biji habbatussauda (*Nigella sativa*), (B) minyak habbatussauda (*Nigella sativa*), (C) limbah habbatussauda (*Nigella sativa*)

Log cfu menjadi 7,05 log cfu, dan *S. typhimurium* dari 17,24 log cfu menjadi 4,54 log cfu. Efek penghambatan ini terus berlanjut hingga konsentrasi 900  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dengan populasi *E. coli* dan *S. typhimurium* masing-masing menurun hingga 5,47 log cfu dan 3,86 log cfu. Penurunan ini mengindikasikan bahwa ekstrak minyak HS efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, bahkan pada konsentrasi yang relatif rendah dibandingkan dengan nilai MIC TQ murni yang dilaporkan dalam literatur (Kouidhi et al. 2011).

Efektivitas TQ terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium* sejalan dengan hasil studi terdahulu yang menunjukkan

bahwa TQ memiliki spektrum luas terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif. Mekanisme kerjanya diduga melibatkan penghambatan biofilm, gangguan terhadap integritas membran sel, serta penghambatan aktivitas pompa eflux, yang menyebabkan akumulasi senyawa toksik di dalam sel bakteri (Chaieb et al. 2011). Hal ini memberikan keunggulan TQ dibandingkan agen antimikroba lain terutama terhadap bakteri Gram negatif yang cenderung lebih resisten akibat struktur membran ganda dan keberadaan lipopolisakarida Mingeot-Leclercq dan Decout 2016). Menariknya, pada bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* sp. dan *Bifidobacteria* sp., efek penghambatan baru terlihat signifikan pada konsentrasi TQ  $\geq 600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , terutama terhadap *Lactobacillus* sp. yang jumlahnya menurun tajam pada konsentrasi 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ke atas. Meskipun demikian, *Bifidobacteria* sp. menunjukkan toleransi yang relatif lebih tinggi terhadap peningkatan kadar TQ, dengan populasi tetap di atas 9 log cfu hingga konsentrasi 900  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dan baru menurun drastis menjadi 8,68 log cfu pada 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak TQ masih cukup selektif dalam menargetkan bakteri patogen, dengan dampak yang lebih kecil terhadap bakteri non-patogen dalam sistem pencernaan.

Berdasarkan temuan ini, dapat disimpulkan bahwa penggunaan ekstrak minyak habbatussauda dengan konsentrasi TQ hingga 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  masih tergolong aman terhadap mikrobiota usus yang menguntungkan, dan berpotensi dikembangkan sebagai bahan tambahan fungsional dalam pakan atau produk kesehatan. Struktur lapisan membran ganda Gram negatif memungkinkan interaksi lebih efektif dengan senyawa amfifilik seperti TQ, sehingga meningkatkan permeabilitas membran dan efektivitas penghambatan (Tavares et al. 2020).

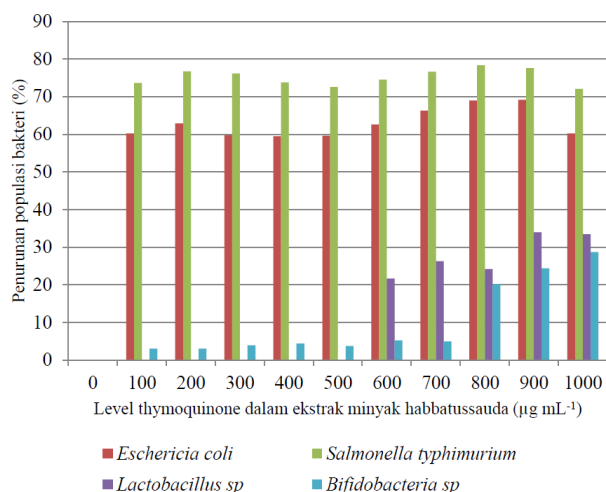
Visualisasi data dalam bentuk grafik batang pada Gambar 2 menggambarkan persentase penurunan populasi bakteri akibat perlakuan ekstrak minyak *Nigella sativa* (Habbatussauda) pada berbagai level konsentrasi thymoquinone (TQ).

**Tabel 7** Populasi beberapa bakteri yang diberi ekstrak minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) dalam level thymoquinone berbeda selama 24 jam (log 10 cfu)

Level TQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Bifidobacteria</i> sp
0	17,74 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	17,24 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	9,09 $\pm$ 0,63 <sup>c</sup>	12,17 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
100	7,05 $\pm$ 0,11 <sup>bc</sup>	4,54 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	9,66 $\pm$ 0,83 <sup>bc</sup>	11,80 $\pm$ 0,83 <sup>ab</sup>
200	6,58 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	4,01 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	10,61 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	11,80 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>
300	7,14 $\pm$ 0,53 <sup>bc</sup>	4,11 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	10,12 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	11,69 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>
400	7,19 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	4,52 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	9,08 $\pm$ 0,37 <sup>c</sup>	11,63 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>
500	7,16 $\pm$ 0,45 <sup>bc</sup>	4,73 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	9,08 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	11,71 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>
600	6,64 $\pm$ 0,22 <sup>bc</sup>	4,39 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	7,12 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	11,53 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
700	5,98 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>	4,03 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	6,70 $\pm$ 0,40 <sup>d</sup>	11,56 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
800	5,50 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>	3,74 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	6,89 $\pm$ 0,34 <sup>d</sup>	9,71 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
900	5,47 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	3,86 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	6,00 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	9,20 $\pm$ 0,08 <sup>cd</sup>
1000	7,05 $\pm$ 0,11 <sup>bc</sup>	4,82 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	6,05 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	8,68 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>

Rataan yang memiliki superskrp yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )





**Gambar 2** Efek pemberian ekstrak minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) pada level berbeda terhadap penurunan populasi bakteri.

Grafik ini memperjelas perbedaan sensitivitas antar spesies bakteri terhadap perlakuan, yang tidak hanya penting secara statistik, tetapi juga relevan secara biologis dalam konteks aplikasi antimikroba alami. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dilihat bahwa penurunan populasi tertinggi terjadi pada *E. coli* dan *S. typhimurium*, dengan penurunan mencapai lebih dari 60% – 80% pada konsentrasi 800–900 µg mL<sup>-1</sup> TQ. Sebaliknya, bakteri menguntungkan seperti *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacteria sp.* menunjukkan penurunan yang jauh lebih rendah (<30%) pada konsentrasi yang sama, bahkan pada konsentrasi rendah (100–500 µg mL<sup>-1</sup>) hampir tidak menunjukkan penurunan yang signifikan. Efek antibakteri dari ekstrak minyak HS ini sangat mungkin ditopang oleh sifat fisikokimia thymoquinone yang bersifat lipofilik dan amfifilik. Senyawa lipofilik memiliki kecenderungan tinggi untuk menembus membran lipid bilayer bakteri, terutama membran luar bakteri Gram negatif yang mengandung lipopolisakarida (LPS) sebagai komponen utama (Epand et al. 2016). Interaksi ini menyebabkan terganggunya integritas membran, meningkatkan permeabilitas, dan akhirnya menginduksi lisis sel. Agen antibakteri umumnya memiliki sifat lipofilik dan kationik, yang memungkinkan gugus bermuatan positif pada rantai sampingnya untuk berinteraksi dengan permukaan membran bakteri yang bermuatan negatif. Sementara itu, bagian lipofilik dari senyawa tersebut akan berasosiasi dengan lapisan lipid membran, sehingga menyebabkan ketidakstabilan struktur membran, kebocoran isi sel, dan akhirnya kematian bakteri (Epand et al. 2016).

Perbedaan efektivitas terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif berkaitan erat dengan struktur dinding selnya. Bakteri gram negatif memiliki dua lapisan membran lipid dengan lapisan peptidoglikan tipis di antaranya. Lapisan luar ini, meskipun berfungsi sebagai penghalang selektif, memiliki pori-pori yang dapat

dilewati senyawa lipofilik kecil seperti TQ (Mingeot-Leclercq dan Décout 2016). Sementara itu, dinding sel gram positif yang tersusun atas peptidoglikan tebal dan tidak memiliki membran luar, dapat memberikan resistensi lebih terhadap difusi senyawa lipofilik tertentu, meskipun secara umum masih rentan terhadap agen amfifilik. Hasil ini juga menguatkan temuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa thymoquinone memiliki spektrum luas terhadap berbagai bakteri patogen (et al. 2011). Fenomena serupa juga diamati pada penelitian ini, di mana penurunan populasi *E. coli* dan *S. typhimurium* secara persentase jauh lebih tinggi dibandingkan bakteri probiotik. Temuan ini penting secara praktis karena menunjukkan bahwa ekstrak minyak habbatussauda dengan kandungan TQ tertentu dapat digunakan secara selektif untuk menghambat bakteri patogen tanpa merusak mikrobiota usus, khususnya pada dosis di bawah 500 µg mL<sup>-1</sup>. Dengan demikian, ekstrak ini memiliki potensi aplikatif sebagai bahan antimikroba alami dalam sistem pakan fungsional atau terapi suportif pada infeksi gastrointestinal, terutama yang melibatkan patogen gram negatif.

## SIMPULAN

Ekstraksi minyak habbatussauda (*Nigella sativa*) dengan metode *cold press* menghasilkan *oil yield* sebesar 34,46% pada suhu rendah yang sesuai untuk menjaga kestabilan senyawa bioaktif. Ekstraksi lanjut menggunakan etanol 70% menunjukkan bahwa fraksi minyak menghasilkan ekstrak pekat tertinggi dengan kandungan thymoquinone sebesar 2855,79 mg L<sup>-1</sup>. Analisis GC-MS mengidentifikasi beragam senyawa bioaktif dari biji, minyak, dan limbah habbatussauda, yang berpotensi sebagai agen fitobiotik. Uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak minyak habbatussauda pada konsentrasi 100 µg mL<sup>-1</sup> efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*. Sementara itu, bakteri menguntungkan seperti *Lactobacillus sp.* dan *Bifidobacteria sp.* tetap relatif tidak terpengaruh hingga konsentrasi TQ 500 µg mL<sup>-1</sup>. Grafik batang memperkuat temuan ini dengan menunjukkan penurunan selektif populasi bakteri patogen. Hasil ini menunjukkan potensi minyak habbatussauda sebagai antimikroba alami yang selektif dan aplikatif untuk pengembangan pakan fungsional atau produk kesehatan berbasis bahan alam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Saleh IA, Billedo G, & El-Doush II. 2006. Level of selenium, tocopherol, thymoquinone and thymol of *Nigella sativa* seed. *Journal of Food Composition Analysis*. 19:167-75.
- Abdullah & Koc B. 2012. Kinetics of ultrasound-assisted oil extraction from black seed (*Nigella sativa*). *Journal of Food Processing and Preservation*. 37(5):814-823.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhoury ZA & Anwar F. 2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of*

- Tropical Biomedicine*. 3(5), 337–352.
- Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K & Bakhrouf A. 2011. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 13:11-29.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian & M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 540–560.
- Eloff JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*. 64 : 711-716.
- Epand RM, Walker C, Epand RF & Magarvey NA. 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1858: 980–987.
- Imad H, Muhanned A, Aamera J & Cheah Y. 2014. Analysis of eleven Y-chromosomal STR markers in middle and south of Iraq. *African Journal of Biotechnology*. 13(38):3860-3871.
- Kareem MA, Hussein AO & Hameed IH .2015. Y-chromosome short tandem repeat, typing technology, locus information and allele frequency in different population: A review. *African Journal of Biotechnology*. 14(27):2175-2178.
- Kouidhi B, Zmantar T, Jrah H, Souiden Y, Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2011. Antibacterial and resistance-modifying activities of thymoquinone against oral pathogens. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 27:10-29.
- Li P, Yin ZQ, Li SL, Huang XJ, Ye WC & Zhang QW. 2014. Simultaneous determination of eight flavonoids and pogostone in Pogostemon cablin by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37(12): 1771–1784.
- Ma C, Liu C, Ahmed AF, Niu Y & Kang W. 2019. Optimum extraction technology for the seed oil of *Nigella sativa* L. 2019. *Hindawi Journal of Food Quality*. 7: 1-6.
- Mahmud HA, Seo H, Kim S, Islam MI, Nam KW, Cho HD & Song HY. 2017. Thymoquinone (TQ) inhibits the replication of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and modulates nitric oxide production. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 17(1): 279-287.
- Matthaus, B. and Brühl, L. 2003. Quality of cold-pressed edible rapeseed oil in Germany. *Nahrung*. 47(6):413–419.
- Mingeot-Leclercq MP & Décout JL. 2016. Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. *Medicinal Chemistry Communications*. 7:586–611.
- Mohammed NK, Abd Manap MY, Tan CP, Muhiaddin BJ, Alhelli AM & Hussin ASM. 2016. The Effects of Different Extraction Methods on Antioxidant Properties, Chemical Composition, and Thermal Behavior of Black Seed (*Nigella sativa* L.) Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-10.
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 58(9-10): 629–631.
- Retnani Y, Wiryawan KG, Khotijah L, Barkah NN, Gustian RA & Dermawan IR. 2019. Growth performance, blood metabolites and nitrogen utilization of lambs fed with *Nigella sativa* meal. *Pakistan Journal of Nutrition*. 18 (3): 247-253.
- Steel RGD & Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerjemah Bambang Sumanti. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka.
- Tavares TD, Antunes JC, Padrao J, Ribeiro AI, Zille A, Amorim M, Ferreira F & Felgueiras HP. 2020. Activity of specialized biomolecules against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 9(6), 314-318.
- Urbanova K, Kloucek P, Havlik J, Valterova I & Kokoska L. 2020. Fast and ecological liquid-liquid separation method for preparing quinones enriched extract from *Nigella sativa* oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 31(4): 739-745.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G & Tan KHB. 2012. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*. 83(4): 443–451.
- Yi Y, Zhang QW, Li SL, Wang Y, Ye WC, Zhao J & Wang YT. 2012. Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 135(2): 528–533.
- Zhang QW, Li GL, & Wen CY. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 13: 20-46.
- Zhou YQ, Zhang QW, Li SL, Yin ZQ, Zhang XQ & Ye WC. 2012. Quality evaluation of semen oroxyli through simultaneous quantification of 13 components by high performance liquid chromatography. *Currently Pharmacological Analysis*. 8(2): 206–213.
- Zuorro A, Lavecchia R, Medici F, & Piga L. 2014. Use of cell wall degrading enzymes for the production of high-quality functional products from tomato processing waste, *Chemical Engineering Transactions*. 38:355–360.