

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare hingga saat ini masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat yang berkontribusi besar terhadap angka kesakitan dan kematian, khususnya di negara berkembang. World Health Organization (WHO) melaporkan bahwa secara global terdapat sekitar 1,7 miliar kasus diare setiap tahun, dengan lebih dari 400.000 kematian pada anak usia di bawah lima tahun. Di Indonesia, diare masih termasuk dalam sepuluh besar penyebab morbiditas dan mortalitas, terutama pada kelompok balita, sehingga upaya pencegahan dan pengobatan yang efektif masih menjadi prioritas kesehatan nasional (WHO, 2023; Kemenkes RI, 2022).

Secara etiologis, diare dapat dipicu oleh berbagai faktor, namun infeksi mikroorganisme patogen merupakan penyebab utama pada diare akut. Bakteri enterik seperti *Escherichia coli* patogenik dan *Shigella* spp. sering ditemukan sebagai agen penyebab diare infeksius, terutama pada kasus diare berdarah. Beberapa subtipe *Escherichia coli*, seperti enterotoksigenik (ETEC) dan enterohemoragik (EHEC), diketahui berperan signifikan terhadap kejadian diare di negara berkembang. Sementara itu, *Shigella* sp. merupakan penyebab utama disentri basiler yang berpotensi menimbulkan komplikasi serius apabila tidak ditangani secara adekuat (Khalil et al., 2018; Troeger et al., 2020).

Infeksi bakteri enterik tidak hanya menimbulkan manifestasi klinis akut, tetapi juga dapat mengganggu keseimbangan mikrobiota usus. Gangguan ini dikenal sebagai disbiosis, yaitu kondisi ketidakseimbangan antara mikrobiota komensal dan mikroorganisme patogen di saluran cerna. Disbiosis ditandai oleh penurunan keragaman mikrobiota yang menguntungkan serta peningkatan dominasi bakteri patogen, yang selanjutnya dapat memperberat inflamasi mukosa usus, mengganggu fungsi barrier intestinal, dan meningkatkan risiko diare berulang (Shreiner et al., 2015; Fan & Pedersen, 2021).

Penatalaksanaan diare secara umum meliputi terapi rehidrasi oral, suplementasi zink, serta pengaturan nutrisi. Namun, pada kondisi tertentu seperti shigellosis atau diare berat akibat infeksi *Escherichia coli*, penggunaan antibiotik masih diperlukan untuk memperpendek durasi penyakit dan mencegah komplikasi. Antibiotik yang sering digunakan antara lain kotrimoksazol, fluorokuinolon, dan makrolida. Akan tetapi, penggunaan antibiotik yang luas dan tidak rasional telah berkontribusi terhadap meningkatnya kejadian resistensi bakteri, termasuk resistensi *Escherichia coli* dan *Shigella* spp. terhadap antibiotik lini pertama (Pamer, 2016; McDonald et al., 2018).

Selain menurunkan efektivitas terapi, antibiotik spektrum luas juga dapat memperparah disbiosis usus akibat penekanan terhadap mikrobiota komensal. Kondisi ini mendorong perlunya pencarian agen antibakteri alternatif atau pendukung yang efektif, aman, serta memiliki dampak minimal terhadap keseimbangan mikrobiota usus. Dalam beberapa tahun terakhir, pemanfaatan bahan alam sebagai sumber senyawa antibakteri mendapatkan perhatian yang semakin besar, mengingat keberagaman kandungan fitokimia tanaman dan potensi aktivitas biologisnya (Ozidal et al., 2016; Danneskiold-Samsøe et al., 2019).

Berbagai tanaman telah dimanfaatkan secara tradisional maupun ilmiah dalam penanganan diare, seperti *Psidium guajava* (daun jambu biji) yang digunakan dalam bentuk rebusan atau ekstrak karena kandungan tanin dan flavonoidnya, *Curcuma longa* (kunyit) yang dikenal memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri, serta *Camellia sinensis* (teh) yang kaya akan polifenol. Tanaman lain seperti *Andrographis paniculata* dan *Zingiber officinale* juga dilaporkan memiliki efek antidiare dan antibakteri. Berbagai bahan alam tersebut telah dikembangkan dalam bentuk jamu, obat herbal terstandar, maupun fitofarmaka untuk terapi diare ringan hingga sedang (Heinrich et al., 2020; Kemenkes RI, 2017).

Di Indonesia, pemanfaatan tanaman herbal sebagai pengobatan awal diare masih banyak dilakukan oleh masyarakat, antara lain penggunaan daun jambu biji, teh pahit, dan buah nangka muda. Teh pahit diketahui mengandung tanin yang bersifat astringen, sehingga dapat mengurangi kandungan air pada feses dan menurunkan frekuensi buang air besar. Kandungan tanin tersebut berperan dalam

mengurangi tingkat keparahan diare, meskipun konsumsinya perlu diperhatikan agar tidak menimbulkan efek yang tidak diinginkan (Indrawati et al., 2012; Kurnia et al., 2020; Lestari et al., 2020).

Salah satu tanaman rempah yang berpotensi dikembangkan sebagai agen antibakteri alami adalah ketumbar (*Coriandrum sativum* L.). Ketumbar telah lama digunakan secara tradisional untuk mengatasi gangguan pencernaan seperti kembung, dispepsia, dan diare. Biji ketumbar mengandung berbagai senyawa bioaktif, antara lain minyak atsiri (terutama linalool), flavonoid, tanin, asam fenolat, dan terpenoid yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa ekstrak maupun minyak atsiri ketumbar mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif, termasuk *Escherichia coli*, melalui mekanisme kerusakan membran sel dan gangguan metabolisme bakteri (Laribi et al., 2015; Silva et al., 2020; Zeković et al., 2021).

Berbagai bagian tanaman ketumbar memiliki kandungan kimia dan aktivitas biologis yang berbeda. Biji ketumbar merupakan bagian yang paling banyak diteliti dan diketahui kaya akan minyak atsiri serta senyawa fenolik dengan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Shigella* spp. Daun ketumbar mengandung flavonoid dan senyawa volatil dengan aktivitas antimikroba sedang, sedangkan akar dan batang relatif kurang dieksplorasi (Neffati et al., 2017).

Keunggulan ketumbar dibandingkan tanaman obat lain terletak pada keamanannya sebagai bahan pangan yang umum dikonsumsi, ketersediaannya yang melimpah, serta potensi aktivitas antibakterinya yang relatif selektif. Beberapa laporan menunjukkan bahwa senyawa fenolik dan flavonoid dalam ketumbar dapat menghambat bakteri patogen tanpa sepenuhnya menekan mikrobiota komensal, sehingga berpotensi menurunkan risiko disbiosis usus. Hingga saat ini, pemanfaatan ketumbar dalam terapi diare masih didominasi oleh bentuk simplisia atau ramuan tradisional, sedangkan sediaan farmasi modern berbasis ekstrak ketumbar masih terbatas dan umumnya dipasarkan sebagai suplemen kesehatan. Hal ini menunjukkan peluang pengembangan lebih lanjut ekstrak ketumbar sebagai agen terapeutik berbasis bukti ilmiah (Neffati et al., 2017; Zeković et al., 2021).

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak etanol biji ketumbar, mengingat etanol merupakan pelarut yang efektif untuk mengekstraksi senyawa polar hingga semi-polar seperti flavonoid, fenolik, dan sebagian komponen minyak atsiri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram, yang merupakan metode standar, sederhana, dan reproduksibel, serta memungkinkan perbandingan langsung dengan antibiotik standar. Kotrimoksazol digunakan sebagai kontrol positif karena masih digunakan dalam praktik klinis dan memiliki spektrum aktivitas terhadap *Escherichia coli* dan *Shigella* spp. (CLSI, 2023). Identifikasi senyawa aktif dilakukan menggunakan metode Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS), yang memiliki sensitivitas tinggi dalam mengidentifikasi metabolit sekunder tanaman dan memberikan gambaran profil senyawa bioaktif yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri (El-Sayed et al., 2022; Saleem et al., 2023).

Sebagaimana disebutkan dalam Al-Qur'an bahwa Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuhan yang memiliki manfaat bagi manusia (QS. Asy-Syu'ara': 7), serta dalam hadis Rasulullah SAW yang menyatakan bahwa setiap penyakit memiliki obatnya, maka penelitian terhadap potensi tanaman obat merupakan salah satu bentuk ikhtiar ilmiah dalam menggali manfaat alam ciptaan-Nya.

Meskipun sejumlah penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri ketumbar, sebagian besar masih berfokus pada minyak atsiri atau pengujian aktivitas secara umum tanpa mengintegrasikan hubungan antara aktivitas antibakteri, profil senyawa aktif, dan perbandingan dengan antibiotik standar. Selain itu, kajian yang mengaitkan antibakteri bahan alam dengan konsep disbiosis usus masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar terhadap *Escherichia coli* dan *Shigella* spp. secara *in vitro* serta mengidentifikasi profil senyawa aktifnya sebagai dasar ilmiah pengembangan agen antibakteri alami yang lebih aman dan berkelanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar terhadap bakteri *Escherichia coli* penyebab diare secara *in vitro*?

2. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar terhadap bakteri *Shigella spp.* penyebab diare secara in vitro?
3. Seberapa besar efektivitas ekstrak etanol biji ketumbar dibandingkan dengan antibiotik standar dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Shigella spp.* secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar terhadap *Escherichia coli* dan *Shigella sp.* serta profil senyawa aktifnya.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis daya hambat ekstrak etanol biji ketumbar terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.
2. Menganalisis daya hambat ekstrak etanol biji ketumbar terhadap pertumbuhan *Shigella spp.*
3. Membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar dengan kotrimoksazol sebagai kontrol positif.
4. Mengidentifikasi profil senyawa aktif ekstrak etanol biji ketumbar menggunakan metode LC-MS.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Ilmiah

1. Memberikan kontribusi pada ilmu farmakologi herbal dengan menyediakan data ilmiah mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji ketumbar terhadap *Escherichia coli* dan *Shigella spp.*
2. Menjadi dasar pengembangan konsep fitofarmaka antidiare, khususnya dari tanaman lokal Indonesia yang berpotensi sebagai terapi berbasis bukti (evidence-based herbal medicine).
3. Menambah literatur mengenai mekanisme antibakteri senyawa fitokimia, seperti flavonoid, tanin, dan linalool dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab diare.
4. Mendukung penguatan teori resistensi antibiotik dengan menawarkan alternatif agen antibakteri alami yang dapat mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik sintetik.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Sebagai informasi awal bagi tenaga kesehatan mengenai potensi ekstrak ketumbar sebagai alternatif pendukung terapi diare akibat infeksi bakteri.
2. Menjadi referensi untuk penelitian lanjutan, seperti uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), formulasi sediaan fitofarmaka, uji toksisitas, dan uji in vivo.
3. Mendukung upaya kemandirian obat tradisional nasional, sejalan dengan strategi Kementerian Kesehatan dan BPOM dalam pemanfaatan tanaman lokal sebagai bahan baku fitofarmaka.
4. Memberikan landasan bagi pemanfaatan ketumbar secara lebih rasional dan terarah, tidak hanya sebagai bumbu dapur tetapi sebagai agen terapeutik berbasis bukti.

1.5 Landasan Teori

1.5.1. Klasifikasi dan Morfologi Ketumbar (*Coriandrum Sativum L*)



Gambar 1. Biji Ketumbar (Sumber: Liah Kodriah et al., 2020)

Ketumbar (*Coriandrum sativum* L.) merupakan tanaman herbal yang termasuk dalam famili Apiaceae. Berdasarkan klasifikasi botani, tanaman ketumbar dikelompokkan ke dalam Kingdom *Plantae*, Divisi *Spermatophyta*, Subdivisi *Angiospermae*, Kelas *Dicotyledonae*, Ordo *Apiales*, dan Genus *Coriandrum* (Hapsari et al., 2016).

Secara morfologi, tanaman ketumbar memiliki tinggi sekitar 75–95 cm dengan batang lunak beralur dan berwarna hijau. Sistem perakarannya berupa akar tunggang yang berkembang cukup baik. Daun ketumbar merupakan daun majemuk menyirip dengan warna hijau hingga hijau keputihan. Bunga ketumbar berwarna putih keunguan, tersusun dalam bentuk payung majemuk, serta memiliki lima benang sari dan satu putik.

Buah ketumbar berbentuk bulat hingga lonjong dengan diameter sekitar 3–4 mm. Buah berwarna hijau saat muda dan berubah menjadi cokelat kekuningan ketika matang. Biji ketumbar tersusun berkelompok dan memiliki berat sekitar 20–30 g per 1.000 biji. Tanaman ini mampu beradaptasi dengan baik pada berbagai kondisi lingkungan, baik di dataran rendah maupun dataran tinggi, sehingga mudah dibudidayakan sepanjang tahun.

1.5.2. Manfaat dan Kandungan Ketumbar

Tanaman rempah telah lama dimanfaatkan di berbagai negara sebagai bahan pangan sekaligus sebagai obat tradisional. Salah satu tanaman rempah yang memiliki nilai farmakologis adalah ketumbar (*Coriandrum sativum* L.). Bagian tanaman yang paling sering digunakan adalah biji dan daun, baik sebagai bumbu masakan maupun sebagai bahan obat tradisional. Minyak atsiri dan ekstrak ketumbar dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis, antara lain antibakteri, antijamur, antiinflamasi, antidiabetes, antihiperkolesterolemia, hingga potensi antikanker (Hijriah et al., 2022).

Biji ketumbar mengandung beragam komponen kimia, meliputi air, protein, lemak, serat, pati, gula, mineral, serta minyak atsiri. Minyak atsiri biji ketumbar didominasi oleh linalool sebagai komponen utama, disertai α -pinene, γ -terpinene, geranyl acetate, camphor, dan geraniol dalam jumlah lebih kecil. Kombinasi senyawa tersebut berperan dalam memberikan aroma khas sekaligus aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif.

Selain minyak atsiri, ekstrak biji ketumbar juga diketahui mengandung metabolit sekunder lain seperti flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan triterpenoid. Keberadaan senyawa-senyawa tersebut mendukung potensi ketumbar sebagai agen antimikroba alami. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak biji ketumbar mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan pembentukan zona hambat yang meningkat seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak (Hasanah & Dori, 2019).

1.5.5.1. Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang dikenal luas memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Secara struktur, flavonoid tersusun atas 15 atom karbon dengan kerangka C6–C3–C6 yang terdiri dari dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh rantai propana. Senyawa ini bersifat polar karena memiliki banyak gugus hidroksil, sehingga mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol dan metanol (Ifora et al., 2021).

Aktivitas antibakteri flavonoid terjadi melalui beberapa mekanisme, antara lain pembentukan kompleks dengan protein dinding sel bakteri yang menyebabkan kerusakan membran dan kebocoran isi sel. Selain itu, flavonoid juga mampu menghambat sintesis DNA dan RNA bakteri melalui pembentukan ikatan hidrogen, serta mengganggu sistem respirasi sel yang berperan dalam produksi energi. Gangguan terhadap metabolisme energi tersebut menyebabkan terhambatnya pertumbuhan hingga kematian sel bakteri (Ifora et al., 2021; Saptowo, 2022).

1.5.5.2. Tanin

Tanin merupakan metabolit sekunder dari golongan polifenol yang dikenal memiliki aktivitas sebagai antidiare, antibakteri, dan antioksidan. Berdasarkan struktur kimianya, tanin dibedakan menjadi tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Senyawa ini bersifat sensitif terhadap panas dan dapat mengalami perubahan struktur pada suhu di atas 60°C.

Pada konsentrasi rendah, tanin mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi, tanin menunjukkan efek antibakteri yang lebih kuat dengan cara mengkoagulasi sitoplasma dan membentuk ikatan kompleks dengan protein bakteri. Mekanisme antibakteri tanin meliputi penghambatan aktivitas enzim, gangguan protein transpor, serta pembentukan kompleks dengan dinding sel bakteri yang berujung pada lisis sel (Saptowo, 2022).

1.5.5.3. Saponin

Saponin merupakan senyawa polar yang memiliki sifat mirip deterjen dan mampu membentuk busa. Senyawa ini tidak stabil terhadap pemanasan dan dapat mengalami perubahan struktur pada suhu tinggi. Aktivitas antibakteri saponin berkaitan dengan kemampuannya menurunkan tegangan permukaan membran sel bakteri, sehingga meningkatkan permeabilitas membran dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler. Kerusakan integritas membran ini pada akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri (Saptowo, 2022).

1.5.5.4. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa nitrogen yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif. Mekanisme kerja alkaloid diduga melalui gangguan terhadap komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak sempurna. Selain itu, alkaloid juga dapat menghambat sintesis protein bakteri, yang berdampak pada terganggunya metabolisme dan viabilitas sel (Anggraini et al., 2019).

1.5.5.5. Terpenoid

Terpenoid merupakan kelompok metabolit sekunder terbesar yang terdiri atas rantai hidrokarbon dengan jumlah atom karbon yang bervariasi. Berdasarkan jumlah unit isoprena, terpenoid diklasifikasikan menjadi monoterpen, seskuiterpen, diterpen, triterpen, dan tetraterpen. Beberapa terpenoid yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri antara lain linalool, fitol, serta turunan asam triterpenoid.

Terpenoid bersifat lipofilik dan mudah berinteraksi dengan membran sel bakteri. Mekanisme antibakterinya melibatkan gangguan pembentukan dinding dan membran sel, peningkatan permeabilitas membran, serta penghambatan fungsi enzim penting dalam metabolisme bakteri. Kandungan terpenoid dalam biji ketumbar berperan penting dalam aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram-negatif seperti *Escherichia coli* (Anggraini et al., 2019).

1.5.3. Analisis LCMS/MS

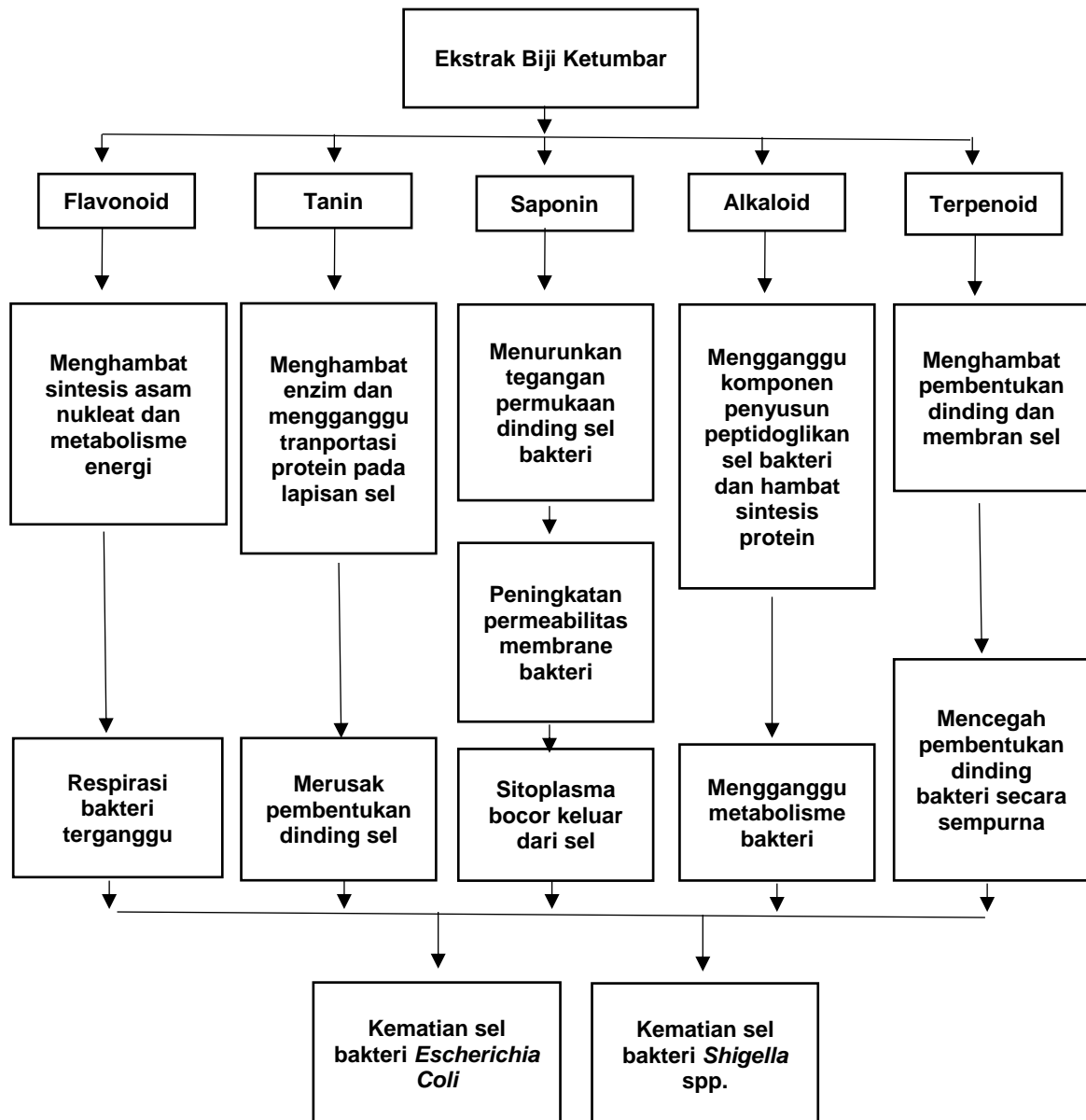
Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan metode analisis yang banyak digunakan dalam penelitian bahan alam untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif dalam ekstrak tanaman. Teknik ini menggabungkan kemampuan pemisahan senyawa yang tinggi dari kromatografi cair dengan sensitivitas dan selektivitas spektrometri massa, sehingga sangat efektif untuk menganalisis matriks kompleks seperti ekstrak tumbuhan (Pitt et al., 2009).

Prinsip kerja LC-MS diawali dengan pemisahan senyawa berdasarkan interaksinya dengan fase diam dan fase gerak pada kolom kromatografi cair. Senyawa yang terelusi selanjutnya diionisasi menggunakan teknik ionisasi lunak, seperti electrospray ionization (ESI), sehingga ion molekul dapat terbentuk tanpa merusak struktur kimianya. Mode ESI positif

umumnya digunakan untuk analisis senyawa polar hingga semipolar, termasuk fenolik dan terpenoid.

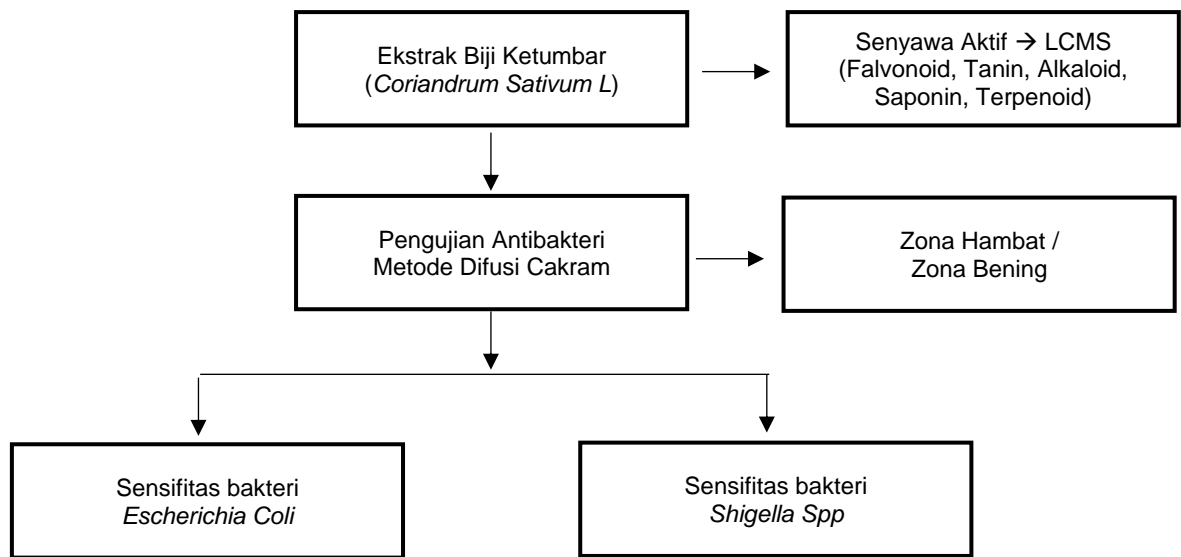
Pada sistem LC-MS, ion prekursor dipilih dan difragmentasi secara terkontrol untuk menghasilkan ion produk yang khas bagi setiap senyawa. Pola fragmentasi ini digunakan sebagai dasar identifikasi tentatif dengan membandingkan nilai m/z, waktu retensi, dan spektrum massa dengan data pustaka atau literatur. Selain identifikasi kualitatif, LC-MS juga memungkinkan analisis semi-kuantitatif melalui persentase luas puncak kromatogram (% area) yang menggambarkan kelimpahan relatif senyawa dalam ekstrak (Sarker & Nahar, 2012).

1.6 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2. Bagan kerangka pikir penelitian

1.7 Kerangka Konsep



Gambar 3. Bagan Kerangka Konsep

1.8 Hipotesis

1. Ekstrak etanol biji ketumbar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro.
2. Ekstrak etanol biji ketumbar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella spp.* secara in vitro.
3. Efektivitas ekstrak etanol biji ketumbar setara atau tidak berbeda secara signifikan dengan antibiotik standar dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Shigella spp.* secara in vitro.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan *post test only control* yaitu perlakuan pemberian ekstrak biji ketumbar (*Coriandrum Sativum L*) terhadap bakteri *Escherichia Coli* dan *Shigella spp.* secara *in vitro* dengan metode difusi cakram untuk mengetahui aktivitas antibakterinya. Lalu dilakukan Uji LCMS/MS untuk mengetahui profil senyawa aktif ekstrak biji ketumbar.

2.2. Tempat dan Waktu Penelitian,

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Makassar pada bulan Desember 2025 - Januari 2026.

2.3. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, blender atau grinder, ayakan, oven pengering, rotary evaporator, inkubator, autoklaf, laminar air flow, mikropipet, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, kertas cakram steril, jangka sorong, serta perangkat LC-MS.

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*), etanol 96% sebagai pelarut ekstraksi, akuades, media Nutrient Agar (NA) atau Mueller-Hinton Agar (MHA), biakan murni *Escherichia coli* dan *Shigella sp.*, larutan NaCl fisiologis 0,9%, antibiotik kotrimoksazol sebagai kontrol positif, serta pelarut ekstrak sebagai kontrol negatif.

2.4. Pelaksanaan penelitian

2.4.1. Prosedur preparasi dan ekstraksi

Biji ketumbar dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan pada suhu kamar atau menggunakan oven dengan suhu rendah hingga diperoleh biji yang kering. Biji kering selanjutnya digiling hingga menjadi serbuk dan diayak untuk memperoleh ukuran partikel yang homogen.

Serbuk biji ketumbar diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan direndam dalam pelarut dengan perbandingan tertentu, kemudian dibiarkan selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Filtrat yang diperoleh disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu terkontrol hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup pada suhu rendah hingga digunakan.

2.4.2. Pembuatan larutan kontrol positif

Pembuatan larutan kontrol positif dimulai dengan menggerus *Cotrimoxazol* 480 mg. Selanjutnya pembuatan larutan dengan menambahkan Aquades sebanyak 5 ml sehingga menjadi 100 mg/ml, kemudian ambil sebanyak 0.001 mg/ml kemudian dilarutkan kedalam 100 ml Aquades sehingga didapatkan konsentrasi 1 µg/µl.

2.4.3. Persiapan Suspensi Bakteri

Isolat bakteri dimurnikan, kemudian satu koloni diambil menggunakan ose steril dan disuspensikan ke dalam 5 mL larutan NaCl fisiologis 0,9%. Kekeruhan suspensi disesuaikan hingga setara dengan standar 0,5 McFarland.

2.4.4. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) steril dituangkan sebanyak 20 mL ke dalam setiap cawan petri dan dibiarkan memadat. Suspensi bakteri diinokulasikan ke permukaan MHA menggunakan *cotton swab* steril yang telah dicelupkan ke dalam suspensi. Pengusapan dilakukan

secara merata ke seluruh permukaan media (horizontal, vertikal, dan diagonal) hingga terbentuk *lawn culture*. Cawan dibiarkan 10 menit agar suspensi meresap.

Kertas cakram steril direndam atau ditetesi larutan ekstrak uji dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 40%. Selain itu, disiapkan cakram kontrol positif yang mengandung cotrimoxazole dan cakram kontrol negatif yang mengandung Na-CMC. Seluruh cakram dibiarkan selama beberapa menit dalam kondisi steril hingga larutan terserap sempurna, kemudian diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi bakteri. Cawan petri selanjutnya diinkubasi secara terbalik pada suhu 37 °C selama 24 jam.

2.4.5. Pengamatan dan Pengukuran

Setelah inkubasi, diamati terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram sebagai indikator aktivitas antibakteri. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter dan dicatat sebagai hasil pengujian pada masing-masing konsentrasi.

2.4.6. Analisis LCMS/MS

Ekstrak etanol biji ketumbar dianalisis menggunakan LC-MS untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Sampel ekstrak disiapkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian diinjeksi ke sistem kromatografi cair. Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kolom kromatografi dengan fase gerak gradien.

Ionisasi dilakukan menggunakan electrospray ionization (ESI) pada mode positif. Data yang diperoleh dianalisis berdasarkan nilai massa molekul (m/z), waktu retensi, serta pola fragmentasi ion. Identifikasi senyawa dilakukan secara tentatif dengan membandingkan data spektrum massa dengan pustaka dan literatur yang relevan.

2.4.7. Analisis Data

Analisis data uji statistik dilakukan dengan uji ANOVA satu arah (*one-way ANOVA*). Uji statistik diperlukan untuk membandingkan efektivitas ekstrak pada berbagai konsentrasi (10%, 20%, dan 40%) serta untuk menilai perbedaan yang signifikan antara perlakuan ekstrak dengan kontrol negatif (Na-CMC) dan kontrol positif (Cotrimoxazole).