

BAB I

PENDAHULUAN

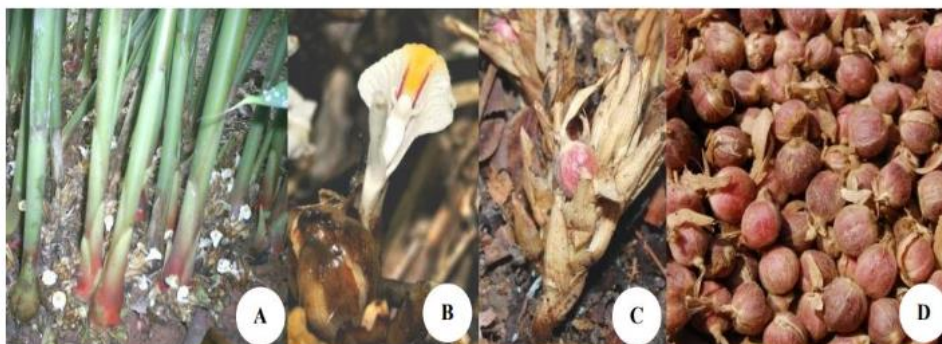
1.1 Latar Belakang

Salmonella typhi adalah bakteri gram negatif penyebab utama demam tifoid, sebuah infeksi sistemik yang berdampak signifikan pada kesehatan masyarakat di seluruh dunia (Chattaway et al., 2021). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi (umumnya dikenal sebagai *Salmonella typhi*), dan biasanya menyebar melalui konsumsi makanan atau air yang terkontaminasi. Infeksi ini dapat menyebabkan gejala seperti demam tinggi yang berkepanjangan, kelelahan, sakit kepala, mual, kehilangan nafsu makan, serta konstipasi atau diare (WHO., 2018). Pencegahan demam tifoid sangat bergantung pada peningkatan sanitasi dan kebersihan, termasuk akses terhadap air bersih dan praktik pengolahan makanan yang aman. Vaksinasi juga merupakan strategi penting dalam mengendalikan penyebaran penyakit ini, terutama di daerah dengan risiko tinggi (WHO., 2019).

Pengobatan demam tifoid hingga saat ini masih sangat bergantung pada antibiotik, terutama kloramfenikol, ampisilin, dan trimetoprim–sulfametoksazol. Kloramfenikol secara klasik bekerja dengan menghambat sintesis protein bakteri melalui ikatan pada subunit ribosom 50S, sehingga menghambat aktivitas peptidil transferase dan menghentikan elongasi rantai polipeptida. Namun, penggunaan kloramfenikol secara luas dan jangka panjang telah mendorong munculnya mekanisme resistensi pada *Salmonella typhi*. Mekanisme resistensi ini meliputi produksi enzim chloramphenicol acetyltransferase (CAT) yang menginaktivasi kloramfenikol melalui proses asetilasi, mutasi pada target ribosom, serta peningkatan sistem efflux pump yang menurunkan konsentrasi antibiotik intraseluler. Akibatnya, efektivitas kloramfenikol menurun drastis dan tingkat resistensi di beberapa wilayah dilaporkan mencapai lebih dari 60%, sehingga banyak pasien tidak lagi merespons terapi lini pertama secara optimal (Yousaf et al., 2024). Secara epidemiologis, peningkatan resistensi kloramfenikol pada *Salmonella typhi* berkaitan erat dengan penggunaan antibiotik yang tidak rasional, seperti dosis subterapeutik dan penghentian terapi sebelum waktunya, yang menciptakan tekanan seleksi pada bakteri. Resistensi umumnya dimediasi oleh gen *cat* yang mengkode enzim chloramphenicol acetyltransferase (CAT) dan sering terletak pada plasmid R, sehingga dapat menyebar melalui transfer gen horizontal. Selain itu, keberadaan integron serta sistem efflux pump seperti AcrAB-TolC mempercepat penyebaran resistensi dan menimbulkan fenomena resistensi silang. Secara global, peningkatan kasus tifoid dengan pola multidrug-resistant (MDR) bahkan extensively drug-resistant (XDR) menunjukkan bahwa terapi konvensional semakin terbatas. Kondisi ini menegaskan urgensi eksplorasi agen antibakteri alternatif berbasis tanaman, seperti kapulaga, yang memiliki mekanisme kerja multipel sehingga berpotensi menekan risiko resistensi (WHO., 2019; Nuzzo et al., 2022).

Selain masalah resistensi, kloramfenikol juga dikaitkan dengan efek samping serius, seperti supresi sumsum tulang, anemia aplastik, dan toksisitas hepatik, yang membatasi penggunaannya terutama pada terapi jangka panjang dan populasi rentan. Kondisi ini mendorong kebutuhan mendesak akan alternatif terapi yang tidak hanya efektif secara antibakteri, tetapi juga lebih aman dan berkelanjutan (Orimaye et al., 2024).

Kapulaga merupakan tanaman dari keluarga Zingiberaceae yang banyak digunakan dalam dunia kuliner dan pengobatan tradisional. Tanaman ini tersebar luas di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, Thailand, dan Malaysia (Silalahi et al., 2015). Kapulaga memiliki berbagai manfaat farmakologis karena kandungan senyawa bioaktifnya, seperti flavonoid, fenolik, alkaloid, saponin, dan minyak atsiri yang memberikan efek antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, serta antikanker (Wahyu et al., 2023). Gambar di bawah ini menunjukkan morfologi tanaman kapulaga, yang meliputi beberapa bagian penting yang sering dimanfaatkan, baik dalam pengobatan tradisional maupun sebagai bahan pangan



Gambar 1. Tanaman Kapulaga . (A) Batang, (B) Bunga, (C) Buah, (D) Biji
(Sumber : Setyawan dkk., 2014)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kapulaga mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, baik gram positif maupun gram negative. Ekstrak etil asetat dari biji kapulaga menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dengan diameter zona hambat masing-masing sebesar $15,15 \pm 1,34$ mm dan $13,50 \pm 0,70$ mm. Selain itu, ekstrak etanol buah kapulaga yang diformulasikan menjadi sediaan obat kumur menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans*, dengan daya hambat tertinggi 12,26 mm dan 9,48 mm. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat buah kapulaga kering memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli*. Hasil-hasil penelitian ini mendukung potensi kapulaga sebagai agen antibakteri alami yang efektif terhadap berbagai bakteri patogen (Sukandar dkk., 2015; Mierza dkk., 2020; Nofriyaldi *et al.*, 2023).

Aktivitas antibakteri ini terutama disebabkan oleh adanya kandungan minyak atsiri seperti 1,8-cineole, α -terpineol, dan limonene yang bekerja dengan cara merusak membran sel bakteri serta menghambat sintesis protein dan enzim yang penting bagi kelangsungan hidup bakteri (Nofriyaldi *et al.*, 2023). Selain itu, senyawa fenolik dan flavonoid dalam kapulaga juga memiliki peran dalam meningkatkan daya tahan tubuh dan mengurangi stres oksidatif yang berkontribusi terhadap berbagai penyakit infeksi. Penelitian oleh Ulfah *et al.* (2023) menunjukkan bahwa ekstrak biji dan herba kapulaga jawa memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan, dengan nilai IC_{50} sebesar 144,339 μ g/mL untuk biji dan 72,37 μ g/mL untuk herba. Kadar fenolik total dalam ekstrak herba mencapai 117,675 mgEAG/g, sedangkan kadar flavonoid total sebesar 6,758 mgEQ/g. Kandungan senyawa fenolik dan flavonoid ini berperan sebagai antioksidan alami yang membantu menetralkan radikal bebas dalam tubuh, sehingga dapat meningkatkan sistem imun dan mengurangi risiko infeksi.

Selain aktivitas antibakterinya, kapulaga juga memiliki sifat antiinflamasi yang dapat membantu meredakan peradangan akibat infeksi bakteri (Abdullah *et al.*, 2022). Mekanisme ini terutama dikaitkan dengan kemampuannya dalam menurunkan produksi sitokin proinflamasi dan menekan aktivitas enzim siklooksigenase (COX) yang berperan dalam proses inflamasi. Ekstrak kapulaga tidak hanya berpotensi sebagai agen antibakteri, tetapi juga sebagai terapi tambahan untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh infeksi bakteri seperti *Salmonella typhi* (Nuzzo *et al.*, 2022).

Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekstrak etanol kapulaga memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai jenis bakteri patogen, seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Sukandar *et al.*, 2015). Namun, efektivitasnya terhadap *Salmonella typhi* masih belum banyak diteliti secara mendalam, terutama melalui pendekatan berbasis komputasi (*in silico*) dan eksperimen laboratorium (*in vitro*).

Penelitian ini akan dilakukan melalui dua pendekatan, yaitu kajian *in vitro* dan *in silico*. Pendekatan *in vitro* melibatkan pengujian ekstrak etanol kapulaga terhadap *Salmonella typhi* untuk menilai aktivitas antibakterinya. Uji ini akan dilakukan dengan metode difusi agar dan dilusi cair, yang memungkinkan peneliti untuk menentukan konsentrasi minimum hambatan (MIC) ekstrak kapulaga terhadap pertumbuhan bakteri.

Penelitian ini secara khusus menggunakan sampel biji kapulaga sebagai bahan utama dalam ekstraksi senyawa bioaktif. Biji kapulaga diketahui memiliki kandungan minyak atsiri yang lebih tinggi

dibandingkan bagian lainnya, sehingga potensinya sebagai antibakteri lebih optimal. Kandungan utama dalam minyak atsiri biji kapulaga, seperti 1,8-cineole, α -terpineol, dan limonene, telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang kuat (Abdullah *et al.*, 2022). Penelitian lain yang mengidentifikasi senyawa bioaktif dalam kapulaga menggunakan pelarut metanol, menemukan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa seperti 1,8-cineole dan α -terpineol, mendukung bahwa pelarut metanol dapat mengekstraksi senyawa tersebut (Irvan dkk., 2015). Selain senyawa-senyawa tersebut, ekstrak metanol biji kapulaga juga mengandung senyawa bioaktif lain yang bersifat antibakteri. Senyawa fenolik dan flavonoid yang larut dalam metanol diduga berperan dalam aktivitas antibakteri ini (Putri dkk., 2016; Abdullah *et al.*, 2022; Abdurahman *et al.*, 2024). Oleh karena itu, penelitian ini akan mengeksplorasi efektivitas ekstrak biji kapulaga dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*

Proses ekstraksi, metanol dipilih sebagai pelarut karena memiliki kemampuan ekstraksi yang lebih baik dibandingkan etanol dalam melarutkan senyawa bioaktif polar dan semi-polar, termasuk flavonoid, alkaloid, dan tanin, yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi. Keunggulan ekstrak metanol juga mencakup efisiensi dalam mengekstraksi senyawa fenolik yang berkontribusi terhadap aktivitas antimikroba yang kuat. Dengan demikian, penggunaan ekstrak metanol diharapkan dapat menghasilkan konsentrasi senyawa bioaktif yang lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* (Masita dkk., 2023).

Dalam era perkembangan teknologi digital, metode *in silico* menjadi salah satu pendekatan yang semakin banyak digunakan dalam penelitian obat dan senyawa bioaktif. Metode ini mengandalkan pemodelan dan simulasi berbasis komputer untuk mengevaluasi potensi interaksi senyawa terhadap target biologis tertentu. Metode *in silico* memungkinkan analisis interaksi antara senyawa bioaktif dalam ekstrak metanol biji kapulaga dengan target molekuler spesifik dari *Salmonella typhi*, seperti enzim atau protein esensial yang berperan dalam virulensi bakteri. Studi *in silico* dapat membantu dalam mengidentifikasi mekanisme kerja dari senyawa aktif yang terkandung dalam kapulaga serta potensi afinitasnya terhadap target biologis yang relevan. Teknik ini dapat dilakukan melalui molecular docking, dinamika molekuler, dan analisis farmakokinetik yang memberikan gambaran awal mengenai efektivitas suatu senyawa sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut di laboratorium (Kusumawati dkk., 2021).

Sementara itu, pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan ekstrak metanol biji kapulaga dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* secara langsung melalui metode antibakteri sumuran. Metode sumuran dipilih karena dapat memberikan hasil yang lebih akurat dalam menentukan zona hambat dari ekstrak uji terhadap bakteri target (Febriani dkk., 2022). Selain itu, metode ini lebih sensitif dalam mengukur efektivitas antibakteri dibandingkan metode difusi cakram karena sumuran memungkinkan konsentrasi ekstrak lebih terkonsentrasi di area pengujian. Metode sumuran juga memberikan fleksibilitas dalam menguji berbagai konsentrasi ekstrak secara bersamaan, sehingga dapat memberikan data yang lebih komprehensif terkait daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri. Pada metode ini, ekstrak metanol kapulaga akan dimasukkan ke dalam sumuran yang dibuat pada media agar yang telah diinokulasi dengan *Salmonella typhi*, sehingga dapat diamati zona hambat pertumbuhan bakteri secara jelas. Hasil pengujian ini, akan diperoleh informasi mengenai nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC) dari ekstrak metanol biji kapulaga terhadap *Salmonella* (Purnamaningsih dkk., 2020).

Kombinasi kedua metode ini, yaitu *in silico* dan *in vitro* dengan metode antibakteri sumuran, diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai potensi antibakteri biji kapulaga. Metode *in silico* memungkinkan prediksi interaksi molekuler antara senyawa aktif dengan target protein dari *Salmonella typhi*, sedangkan metode *in vitro* memberikan data empiris mengenai efektivitas senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri secara langsung. Dengan mengintegrasikan hasil dari kedua pendekatan ini, penelitian dapat memperoleh gambaran yang lebih utuh tentang aktivitas biologis dan mekanisme kerja senyawa bioaktif dalam biji kapulaga.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak metanol biji kapulaga sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* melalui pendekatan *in silico* dan *in vitro* menggunakan metode antibakteri sumuran. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru dalam pengembangan agen antibakteri alami yang potensial dalam penanganan infeksi tifoid, mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik sintetis, serta menjadi dasar

bagi penelitian lanjutan dalam bidang farmasi dan bioteknologi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah yaitu, “Bagaimana efektivitas ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan Umum dari penelitian ini adalah mengetahui efektivitas ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Mengetahui efektivitas ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* secara *in vitro*
- b. Mengetahui nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak metanol biji kapulaga terhadap *Salmonella typhi*
- c. Menganalisis senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam ekstrak metanol biji kapulaga yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* berdasarkan analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).
- d. Mengetahui potensi senyawa bioaktif dalam ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* berdasarkan analisis *in silico* menggunakan metode molecular docking.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

- a. Menambah wawasan ilmiah mengenai potensi ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) sebagai agen antibakteri terhadap *Salmonella typhi*.
- b. Memberikan kontribusi dalam pengembangan metode skrining senyawa bioaktif menggunakan pendekatan *in silico* dan uji *in vitro*.
- c. Menyediakan data ilmiah mengenai kandungan senyawa bioaktif kapulaga yang teridentifikasi melalui GC-MS dan potensinya dalam menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*.
- d. Menjadi referensi bagi penelitian selanjutnya dalam pengembangan obat herbal berbasis kapulaga untuk terapi infeksi bakteri.

1.4.2. Manfaat Praktis

- a. Memberikan alternatif antibakteri alami yang berpotensi mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik sintesis dalam penanganan infeksi *Salmonella typhi*.
- b. Menyediakan informasi yang dapat dimanfaatkan oleh industri farmasi dan herbal dalam mengembangkan produk berbasis ekstrak kapulaga.
- c. Mendukung upaya pencarian bahan alami yang efektif dalam mengatasi masalah resistensi antibiotik pada *Salmonella typhi*.
- d. Menjadi dasar bagi formulasi dan pengujian lebih lanjut terhadap potensi ekstrak kapulaga dalam bentuk obat atau suplemen antibakteri.

1.5 Penelitian Pendukung

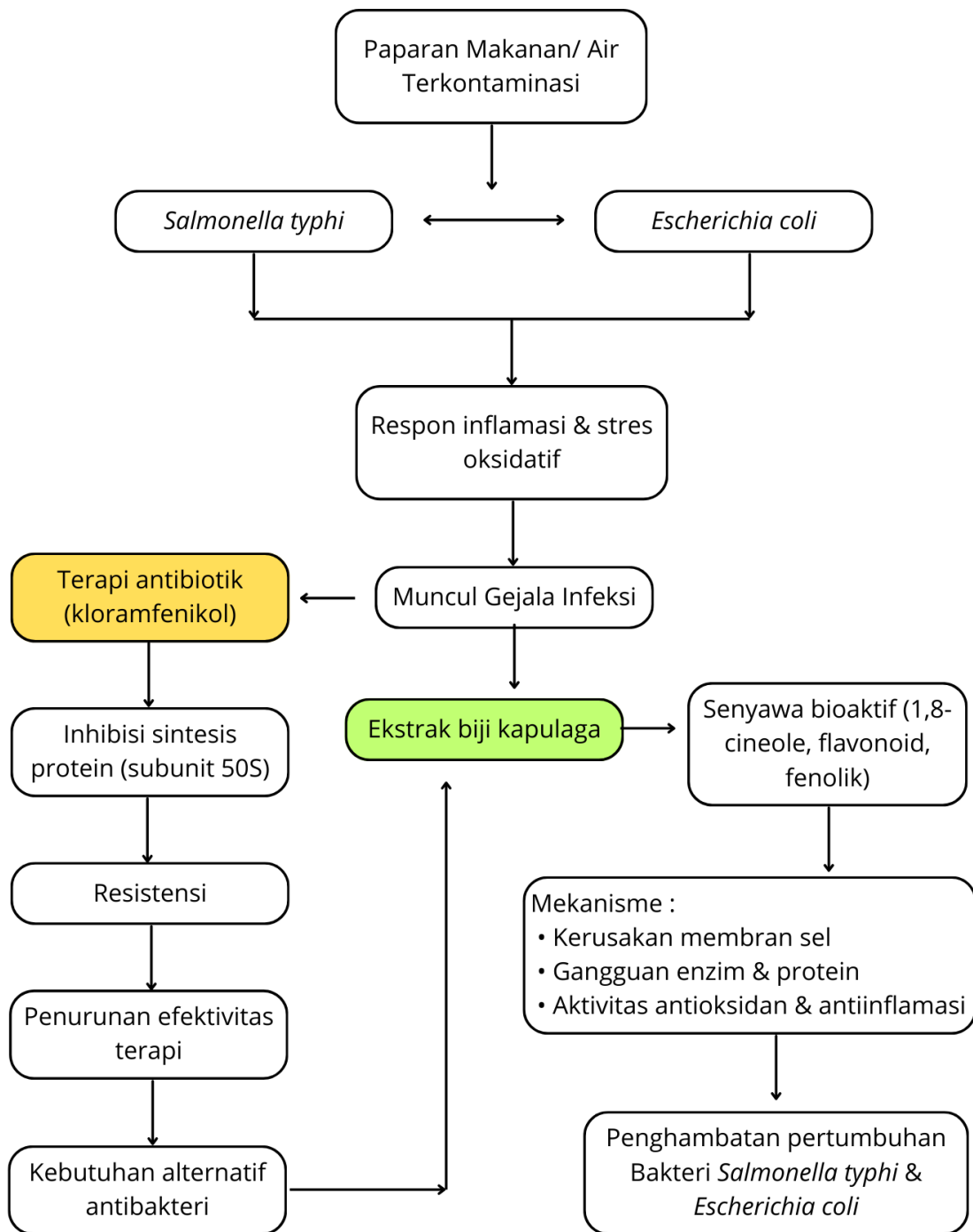
Agar penelitian ini memiliki sifat kebaruan (novelty) dibanding dengan penelitian terdahulu, berikut beberapa penelitian sebelumnya:

Peneliti	Judul	Hasil & Persamaan	Novelty
Alkandahri <i>et al.</i> , (2021)	<i>Amomum compactum</i> : A Review Of Pharmacological Studies	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstrak metanol biji kapulaga menunjukkan zona hambat 15.15 ± 1.34 mm terhadap <i>S. aureus</i> (3,200 $\mu\text{g/ml}$) dan 14.00 ± 2.54 mm terhadap <i>E. coli</i> (800 $\mu\text{g/ml}$). Uji in vitro dengan ekstrak etil asetat menunjukkan hambatan terbesar terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> dengan MIC 2.70% dan OD 0.1677 dengan efektivitas 99.78%. - Sama-sama menggunakan ekstrak metanol biji kapulaga dan menguji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi cakram. 	Penelitian ini lebih spesifik dalam menggunakan metode antibakteri sumuran, menargetkan <i>Salmonella typhi</i> , serta mengombinasikan pendekatan molecular docking (<i>in silico</i>) dan uji laboratorium (<i>in vitro</i>)
Nofriyaldi dkk. (2023)	Efektivitas Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Kapulaga (<i>Amomum compactum Sol. Ex Maton</i>) Terhadap Pertumbuhan <i>Propionibacterium acnes</i> .	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstrak etanol kapulaga diuji terhadap <i>Propionibacterium acnes</i> dengan konsentrasi 5%-30%. Zona hambat tertinggi pada 30% (21,88 mm). -Persamaan dengan studi ini yaitu penggunaan ekstrak kapulaga dan menggunakan metode antibakteri sumuran. 	Penelitian ini menggunakan ekstrak metanol, menargetkan <i>Salmonella typhi</i> , serta mengombinasikan analisis LC-MS dan molecular docking (<i>in silico</i>)
Sukandar dkk. (2015)	Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga (<i>Amomum compactum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstrak etil asetat biji kapulaga memiliki aktivitas antibakteri terhadap <i>S. aureus</i> (15.15 ± 1.34 mm) dan <i>E. coli</i> (13.50 ± 0.70 mm) pada konsentrasi 3,200 $\mu\text{g/mL}$. - Sama-sama meneliti aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga dan menganalisis senyawa bioaktif dengan menggunakan GC-MS mengidentifikasi senyawa 2,9-dihidroksi-1,8-sineol, 2,4-dihidroksi-1,8-sineol, dan 2,2'-metilen bis [6-(1,1-dimetiletil)-4-etil] fenol. 	Penelitian ini menggunakan metode molecular docking (<i>in silico</i>), serta uji antibakteri sumuran terhadap <i>Salmonella typhi</i> yang belum banyak diteliti sebelumnya.

Ainy (2024)	Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Kapulaga (<i>Amomum compactum</i>) sebagai Antibakteri Terhadap <i>Salmonella typhi</i> Secara In Vitro Menggunakan Metode Sumuran	-Ekstrak etanol kapulaga (<i>Amomum Compactum</i>) dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% memiliki sensitivitas terhadap bakteri Salmonella Typhi walaupun tidak sebesar daya hambat oleh Kloramfenikol - Sama-sama meneliti Kapulaga (<i>Amomum compactum</i>) sebagai Antibakteri Terhadap <i>Salmonella typhi</i> Secara In Vitro Menggunakan Metode Sumuran dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25%	Penelitian ini menggunakan konsentrasi pelarut metanol, dan analisis GC-MS, serta menggunakan uji <i>in silico</i> .
-------------	---	---	--

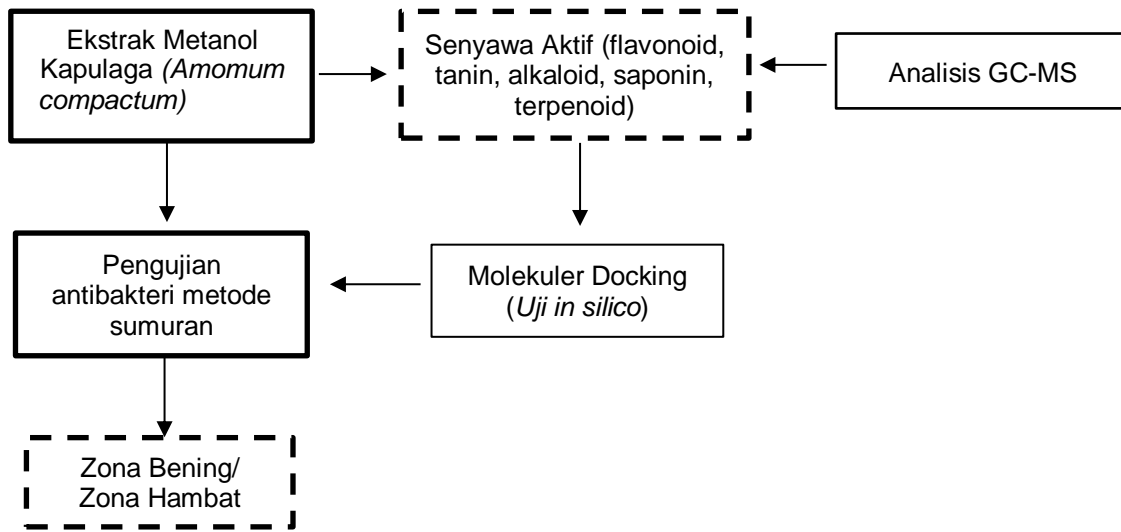
Tabel 1 Penelitian Pendukung

1.6 Kerangka teori



Gambar 2 Kerangka Teori

1.7 Kerangka Konsep



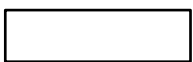
Keterangan



Variabel Dependen



Variabel Independen



Variabel Kontrol

Gambar 3 Kerangka Konsep

1.8 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak metanol biji kapulaga memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Salmonella typhi* berdasarkan pengujian *in vitro* dengan metode antibakteri sumuran.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol biji kapulaga, semakin besar zona hambat yang terbentuk terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*.
3. Senyawa bioaktif dalam ekstrak metanol biji kapulaga dapat berinteraksi dengan protein target *Salmonella typhi* berdasarkan analisis *in silico* menggunakan metode molecular docking.

1.9 Definisi Operasional

- a. Ekstrak yang diperoleh dari biji kapulaga menggunakan pelarut metanol melalui metode ekstraksi maserasi.
- b. Senyawa aktif adalah komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak metanol biji kapulaga yang memiliki potensi sebagai antibakteri. yang diperoleh dari hasil analisis GC-MS.
- c. Metode *In Silico* adalah Pendekatan berbasis komputer yang digunakan untuk menganalisis interaksi senyawa bioaktif dalam ekstrak kapulaga terhadap protein target *Salmonella typhi*. Analisis ini dilakukan menggunakan metode molecular docking untuk mengetahui potensi ikatan dan afinitas senyawa terhadap target bakteri.
- d. Metode *In Vitro* adalah pengujian langsung di laboratorium untuk mengevaluasi daya hambat ekstrak metanol biji kapulaga terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*. Daya hambat diukur dengan metode antibakteri sumuran melalui zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran.
- e. Metode Antibakteri Sumuran adalah Metode difusi agar yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri suatu ekstrak dengan cara membuat sumuran pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm) untuk menentukan efektivitas antibakteri ekstrak.
- f. Zona Hambat adalah Daerah bening di sekitar sumuran yang menunjukkan tingkat inhibisi pertumbuhan *Salmonella typhi* oleh ekstrak metanol biji kapulaga. Semakin besar zona hambat, semakin kuat aktivitas antibakterinya.
- g. GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) adalah Teknik analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif dalam ekstrak metanol biji kapulaga. Data GC-MS memberikan informasi tentang komposisi senyawa yang berperan dalam aktivitas antibakteri.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan pendekatan *in vitro* dan *in silico* untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Salmonella typhi*.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan berjalan pada bulan Mei 2025 sampai selesai.

2.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar

2.3 Sampel Penelitian (*In Vitro*)

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* yang digunakan sebagai subjek uji untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*). Bakteri ini merupakan patogen utama penyebab tifoid (demam tifoid) dan sering digunakan dalam studi antibakteri.

2.3.2 Sample Penelitian

Bakteri uji *Salmonella typhi*, diperoleh dari koleksi laboratorium dan ekstrak metanol biji kapulaga yang diperoleh melalui metode maserasi.

$$\text{Rumus Federer} = (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n: besar sampel tiap kelompok

t: jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan:

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq \frac{15}{4}$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n = 4,75 \approx 5$$

2.3.3 Kriteria Inklusi

Biakan *Salmonella typhi* yang telah dikonfirmasi dan tersedia dalam kondisi murni

2.3.4 Kriteria Eksklusi:

Isolat *Salmonella typhi* yang terkontaminasi atau tidak murni

2.4. Prosedur Preparasi dan Ekstraksi

Biji kapulaga terlebih dahulu dikeringkan untuk memperoleh simplisia kering. Proses pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 3–4 jam hingga biji benar-benar kering dan siap digunakan untuk proses ekstraksi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan degradasi senyawa aktif. Setelah kering, biji kapulaga ditimbang dan dilakukan proses maserasi menggunakan

pelarut metanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut sebesar 1:10 (b/v).

Maserasi dilakukan selama 24 jam dan pelarut diganti setiap 1 × 24 jam, diulang sebanyak tiga kali untuk memastikan senyawa bioaktif terekstraksi secara optimal. Setiap hasil rendaman kemudian disaring untuk memisahkan ampas dan maserat. Ketiga fraksi maserat (maserat 1, 2, dan 3) dicampurkan, lalu disaring kembali untuk menghasilkan maserat akhir yang jernih.

Maserat kemudian diuapkan untuk menghilangkan pelarut. Proses penguapan dilakukan menggunakan oven bersuhu 40–50°C atau dengan rotary evaporator pada suhu 60°C selama kurang lebih 3 jam, hingga pelarut menguap sempurna dan terbentuk ekstrak kental berwujud pasta. Ekstrak kental tersebut ditimbang menggunakan neraca analitik dan disimpan dalam botol vial tertutup rapat. Hasil akhir berupa ekstrak metanol kental dari biji *Amomum compactum* siap digunakan untuk tahap analisis selanjutnya.

2.5. Pembuatan Medium

Media dibuat dengan melarutkan 3,8 gram Muller Hinton Agar dalam 100 ml aquadest dalam labu erlemeyer digoyang-goyang selama 15 menit dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk sampai larut sempurna. Erlemeyer ditutup dengan kapas yang dibungkus dengankain kasa, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Dibiarkendingin sampai suhu 45-50°C, lalu dituangkan kedalam cawan petri yang telah disterilkan ((Utomo *et al.*, 2018; Rasyadi *et al.*, 2019).

2.6. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Koloni bakteri disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis steril dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan dengan vortex kemudian diukur kekeruhannya dengan membandingkan dengan standar kekeruhan larutan Mc.Farland (Aristyawan *et al.*, 2018; Rasyadi *et al.*, 2019).

2.7. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 10 mL media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 1 mL suspensi bakteri *Salmonella typhi* dan dihomogenkan. Campuran tersebut dibiarkan hingga media memadat pada suhu ruang. Setelah media mengeras, cakram kertas steril ditetesi dengan 10 µL sediaan uji ekstrak metanol buah kapulaga (*Amomum compactum*) dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75%. Cakram tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan media dan cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam.

Setelah masa inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dan zona bening (zona hambat) di sekitar cakram diukur sebagai indikator aktivitas antibakteri. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO, sedangkan kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif (Rasyadi *et al.*, 2019).

2.8. Analisis Kandungan Senyawa Biji Kapulaga (*Amomum compactum*)

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif dalam ekstrak metanol biji kapulaga (*Amomum compactum*).

2.9. Uji *In Silico* Molekuler Docking

Senyawa aktif utama dalam ekstrak metanol biji kapulaga diidentifikasi terlebih dahulu menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Senyawa dengan persentase area kromatogram tertinggi dipilih untuk dianalisis lebih lanjut melalui teknik molecular docking. Protein target dari *Salmonella typhi* ditentukan berdasarkan relevansinya dalam patogenesis, kemudian struktur tiga dimensinya diperoleh dari database Protein Data Bank (PDB). Struktur 3D protein disiapkan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools atau PyMOL untuk menghilangkan ligan asli, air, dan menambahkan hidrogen polar serta muatan Gasteiger. Sementara itu, struktur 3D senyawa aktif diperoleh dari PubChem atau dibuat menggunakan ChemDraw, kemudian dikonversi ke dalam format PDB menggunakan Open Babel.

Proses molecular docking dilakukan menggunakan perangkat lunak PyRx, yang mengintegrasikan AutoDock Vina untuk perhitungan afinitas ikatan (binding affinity) dalam satuan kcal/mol. Hasil docking dianalisis berdasarkan kekuatan energi ikatan dan jenis interaksi dengan residu asam amino pada situs aktif protein. Visualisasi dan identifikasi interaksi ligan–protein dilakukan menggunakan PyMOL, sehingga dapat diketahui posisi pengikatan dan kemungkinan mekanisme kerjanya (Setyanto, 2021).

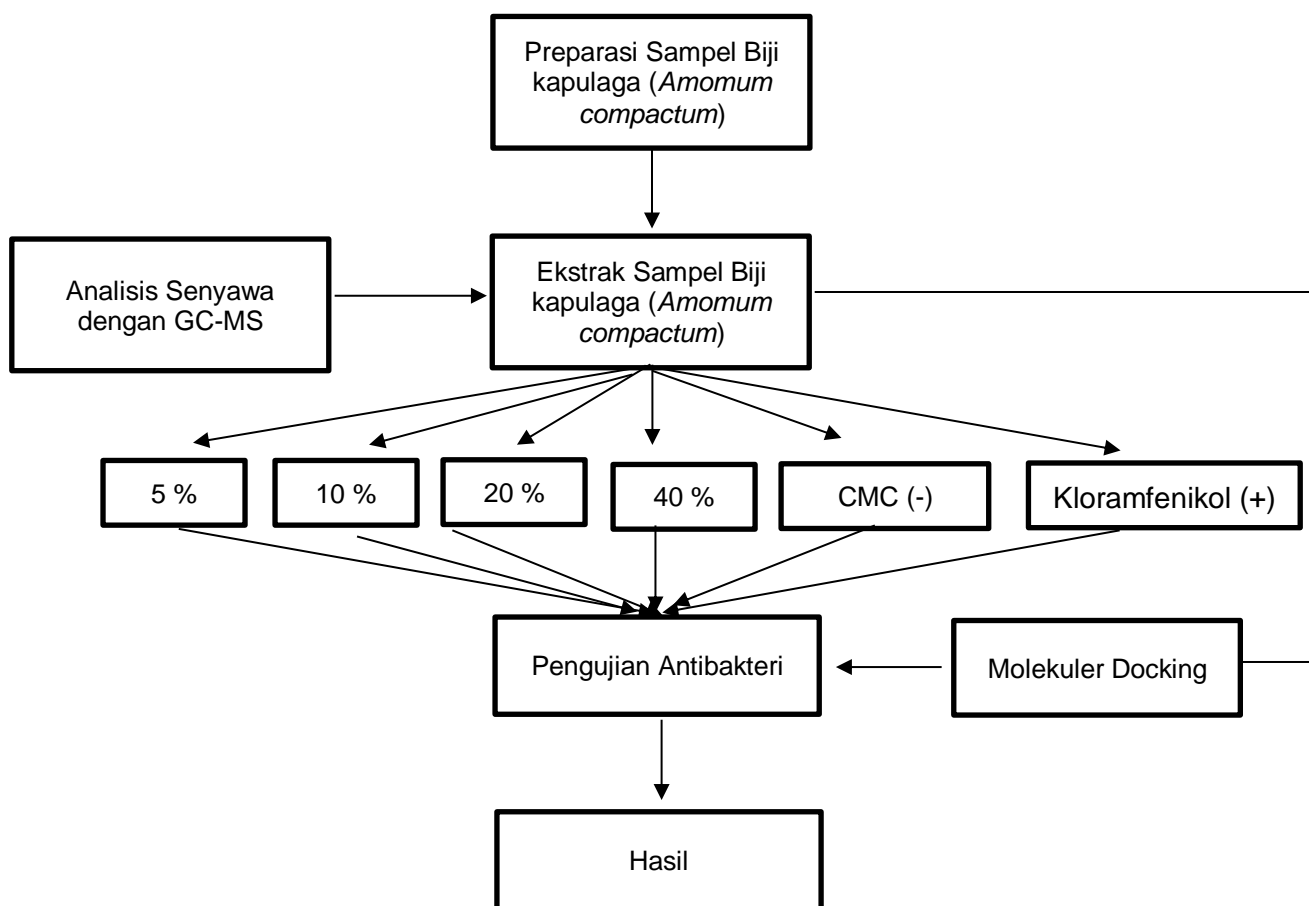
2.10. Analisis Data

Data Potensi dari ekstrak disajikan dalam bentuk narasi dan tabel. Analisis data uji statistik dilakukan dengan uji ANOVA satu arah (*one-way ANOVA*), dilanjutkan dengan uji lanjutan (*post hoc*) jika terdapat perbedaan yang signifikan, dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji statistik diperlukan untuk membandingkan efektivitas ekstrak pada berbagai konsentrasi (25%, 50%, dan 75%) serta untuk menilai perbedaan yang signifikan antara perlakuan ekstrak dengan kontrol negatif (DMSO) dan kontrol positif (kloramfenikol).

2.11. Izin Penelitian dan Kelayakkan Etik

Penelitian ini akan dilakukan setelah mendapat izin penelitian dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar

2.12. Alur Penelitian



Gambar 4 Alur Penelitian