

BAB 2 TINJAUAN TEORITIS

2.1 Kajian Pustaka

2.1.1 Identifikasi Senyawa Aktif melalui *Freeze-Drying* dan GC-MS

Identifikasi senyawa aktif pada tanaman merupakan tahapan penting untuk mengetahui berbagai senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas biologis (F. Sari *et al.*, 2022). Pada sampel cair, seperti air sadapan batang kapulaga, metode *freeze-drying* mampu menghilangkan kandungan air tanpa merusak senyawa aktif didalamnya. *Freeze-drying* atau liofilisasi merupakan metode pengeringan yang dilakukan dengan menghilangkan air dari bahan yang telah dibekukan melalui proses sublimasi, yaitu perubahan dari fase padat (es) langsung menjadi fase gas tanpa melewati fase cair dan umumnya dilakukan pada tekanan yang sangat rendah (1-50 Pa) dengan suhu sekitar -40°C hingga -50°C. Metode ini dinilai efektif dalam menyiapkan sampel tanaman untuk analisis kandungan senyawa bioaktif (Nowak & Jakubczyk, 2020; Sieprawska *et al.*, 2022). Proses *freeze-drying* terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu pembekuan (*freezing*), pengeringan primer (*primary drying/sublimation*), dan pengeringan sekunder (*secondary drying/desorption*) yang dilakukan pada suhu 40–50 °C untuk menghilangkan sisa air yang masih terikat secara kimiawi (Gaidhani *et al.*, 2015; Juckers *et al.*, 2023).

Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menganalisis senyawa metabolit dari suatu tanaman karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, mampu menganalisis campuran kompleks berbagai zat, memiliki biaya analisis per sampel yang relatif rendah serta tersedia basis data spektrum yang sangat luas untuk keperluan identifikasi senyawa (Kojić *et al.*, 2025). Setelah proses *freeze-drying* menghasilkan sampel kering dengan kadar air rendah dan struktur kimia yang stabil, GC–MS digunakan untuk menganalisis senyawa kimia di dalamnya. Prinsip kerja GC–MS melibatkan pemisahan senyawa volatil dalam kolom kapiler berdasarkan perbedaan volatilitas melalui kromatografi gas, kemudian identifikasi dilakukan dengan spektrometri massa yang mengionisasi molekul (Hotmian *et al.*, 2021). Teknik ini mampu mendeteksi berbagai senyawa volatil dan semi-volatil yang banyak terdapat pada tumbuhan obat (Ningsih *et al.*, 2023; Ochoa-Ocampo *et*

al., 2025; Pujiarti & Kusumadewi, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Salehizadeh *et al.*, (2025) menunjukkan bahwa penerapan metode *freeze drying* dan analisis GC-MS mampu mempertahankan sekitar 20% senyawa volatil, dengan hasil identifikasi 62 senyawa yang tervalidasi data literatur. Oleh karena itu, kombinasi metode *freeze-drying* dengan GC-MS dinilai optimal dalam menjaga kestabilan senyawa volatil atau semi-volatil yang mudah terdegradasi oleh panas.

2.1.2 *In Silico*

Istilah *in silico* mengacu pada pendekatan komputasional yang digunakan untuk memprediksi potensi aktivitas biologis suatu senyawa (Roney & Aluwi, 2024; Talevi, 2024). Pendekatan ini telah banyak digunakan di bidang akademik maupun industri karena mampu mengurangi waktu dan sumber daya dalam mengidentifikasi kandidat senyawa potensial yang dapat dijadikan dasar dalam penelitian penemuan dan pengembangan obat baru, serta memungkinkan prediksi efek samping sebelum dilakukan uji eksperimental. Dengan demikian, penelitian dapat dilakukan secara lebih terarah, efisien, dan sejalan dengan prinsip etika karena mengurangi ketergantungan terhadap hewan percobaan (Al-mohaya *et al.*, 2024; Klara *et al.*, 2023; Roney & Aluwi, 2024; Shaker *et al.*, 2021).

Prinsip dasar *in silico* adalah bahwa sifat kimia, aktivitas biologis, serta efek suatu senyawa tercermin dalam struktur molekulnya, sehingga interaksi antara senyawa dan target biologis dapat dianalisis secara komputasional untuk memprediksi kemungkinan aktivitas biologisnya (Madden *et al.*, 2020). Pendekatan *in silico* melibatkan berbagai proses komputasional, seperti pemanfaatan basis data, pemodelan dan penambatan molekuler, pengolahan data untuk menganalisis dan mengoptimalkan molekul yang memiliki afinitas terhadap target biologis serta memahami sifat ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*) dan karakteristik fisikokimia dari suatu senyawa (Salehizadeh *et al.*, 2025).

2.1.3 *Molecular Docking*

Molecular docking telah menjadi aspek penting dalam mengidentifikasi kandidat senyawa potensial yang dapat dijadikan dasar dalam penelitian penemuan dan pengembangan obat baru secara *in silico* selama beberapa tahun terakhir (Agu

et al., 2023). Teknik ini digunakan untuk memprediksi interaksi antara molekul kecil dan protein pada tingkat atom secara komputasional. Molekul berukuran lebih besar seperti protein disebut makromolekul, sedangkan molekul berukuran lebih kecil yang berikatan dengan makromolekul disebut ligan (Sahoo *et al.*, 2022). Tujuan utama dari *molecular docking* adalah untuk menghitung energi afinitas pengikatan antara ligan dan makromolekul, serta menentukan pose pengikatan yang paling optimal. Parameter yang digunakan diantaranya adalah energi bebas pengikatan (*binding affinity*/ ΔG_{bind}), *Root Mean Square Deviation* (RMSD), serta interaksi ligan dengan residu pada situs aktif protein (Najib *et al.*, 2023).

Nilai energi bebas pengikatan atau *binding affinity* menunjukkan tingkat kestabilan interaksi yang terbentuk, karena semakin rendah nilainya, semakin kuat afinitas antara ligan dan makromolekul. Sementara itu, RMSD digunakan untuk menilai kesesuaian konformasi hasil penambatan, nilai $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$ umumnya menunjukkan konformasi yang akurat dan stabil (Hong *et al.*, 2024). Analisis interaksi antara ligan dan residu asam amino pada situs aktif protein digunakan untuk mengidentifikasi jenis ikatan yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, hidrofobik, dan elektrostatik, yang berperan dalam menentukan kekuatan dan stabilitas interaksi ligan dan makromolekul (Y. Wang, 2024). Semakin banyak interaksi yang terbentuk antara ligan dan residu asam amino pada *binding site*, maka kompleks ligan-protein yang terbentuk akan semakin stabil, sehingga meningkatkan potensi ligan dalam menghambat fungsi protein target (Frimayanti *et al.*, 2021).

2.1.4 Fisikokimia dan Farmakokinetik

Fisikokimia dan farmakokinetik merupakan analisis yang digunakan dalam menilai kelayakan senyawa hasil *molecular docking* sebagai kandidat obat. Pada aspek fisikokimia, penilaian difokuskan pada karakteristik molekul yang memengaruhi kelarutan, permeabilitas, dan stabilitas kimia, seperti berat molekul (MW), nilai $\log P$, jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen. Penilaian ini mengacu pada *Lipinski's Rule of Five*, yang menyatakan bahwa suatu senyawa cenderung memiliki kelarutan dan permeabilitas yang baik jika memiliki berat molekul $\leq 500 \text{ g/mol}$, nilai $\log P \leq 5$, jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , dan jumlah

akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 (Ahmad *et al.*, 2023; Miebs & Mielniczuk, 2024). Senyawa yang tidak memenuhi lebih dari satu dari kriteria tersebut umumnya menunjukkan bioavailabilitas oral yang rendah, sehingga kecil kemungkinan dapat diserap secara optimal di dalam tubuh (Pirzada *et al.*, 2024).

Farmakokinetik merupakan analisis yang dilakukan untuk memprediksi bagaimana suatu senyawa akan diserap, didistribusikan, dimetabolisme, dan diekskresikan dalam tubuh (ADME) (Bang *et al.*, 2025). Dengan menggunakan *webserver Swiss-ADME* dan *pkCSM-pharmacokinetics*, parameter yang dianalisis meliputi *water solubility*, permeabilitas Caco-2, dan *intestinal absorption*. Parameter distribusi mencakup *Volume of Distribution steady-state (VD_{ss})* dan *fraction unbound*. Pada tahap metabolisme dianalisis interaksi senyawa terhadap enzim sitokrom P450 utama (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4), sedangkan pada tahap ekskresi dianalisis nilai *Total Clearance (CL_{TOT})* serta interaksi terhadap transporter ginjal OCT2.

2.1.5 Toksisitas

Toksisitas merupakan analisis yang dilakukan untuk mengetahui sifat toksik dan tingkat kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh suatu senyawa terhadap sistem biologis maupun nonbiologis (Praceka *et al.*, 2022). Dalam menilai toksisitas suatu senyawa, *web server ProTox 3.0*, merupakan *platform* yang dapat digunakan untuk mengetahui tingkatan toksisitas berdasarkan struktur kimianya (Setiani *et al.*, 2023). Parameter yang digunakan dalam memprediksi toksisitas meliputi *median lethal dose (LD₅₀)*, kelas toksisitas, hepatotoksisitas, nefrotoksisitas, kardiotoxsisitas, mutagenisitas, karsinogenisitas, imunotoksisitas dan sitotoksisitas. Sebagian besar parameter bersifat kategorikal (aktif atau tidak aktif), kecuali LD₅₀ dan kelas toksisitas yang bersifat numerik (Yeni & Rachmania, 2023). Berdasarkan klasifikasi *Globally Harmonized System (GHS)*, terdapat enam kelas toksisitas, yaitu kelas 1: fatal jika tertelan ($LD_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$), kelas 2: fatal jika tertelan ($5 < LD_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$), kelas 3: beracun jika tertelan ($50 < LD_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$), kelas 4: berbahaya jika tertelan ($300 < LD_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$), kelas 5: mungkin berbahaya jika tertelan ($2000 < LD_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$), dan kelas 6: tidak

beracun ($LD_{50} > 5000$ mg/kg). Semakin tinggi kelas toksisitas, maka tingkat toksiknya semakin rendah (Banerjee *et al.*, 2024).

2.1.6 Kapulaga Jawa (*W. compacta*)

2.1.6.1 Morfologi Kapulaga Jawa (*W. compacta*)

Kapulaga Jawa dengan nama ilmiah *Wurfbainia compacta* (Sol. ex Maton) Skornick. & A.D. Poulsen sebelumnya dikenal dengan nama ilmiah *Amomum compactum* Sol. ex Maton. Namun berdasarkan hasil studi filogenetik molekuler yang dilakukan oleh de Boer *et al.*, (2018) terjadi revisi klasifikasi genus yang memindahkan spesies ini dari genus *Amomum* ke genus *Wurfbainia*, sehingga penamaan ilmiahnya kini secara resmi menggunakan *Wurfbainia compacta* (Sol. ex Maton) Skornick. & A.D. Poulsen. Di Indonesia, terdapat dua jenis kapulaga yang umum dikenal, yaitu kapulaga sabrang (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) dan kapulaga Jawa (*W. compacta*). Jenis *E. cardamomum* merupakan tanaman introduksi yang berasal dari India dan dikenal sebagai *true cardamom*, sedangkan *W. compacta* merupakan jenis asli Indonesia yang telah lama dibudidayakan secara luas di wilayah Sumatera, Jawa, dan Semenanjung Malaya (Mahfur *et al.*, 2023).

Data Statistik Pertanian Hortikultura tahun 2024 menunjukkan bahwa kapulaga Jawa (*W. compacta*) termasuk dalam komoditas biofarmaka dengan volume produksi nasional yang sangat tinggi, yakni mencapai lebih dari 127 juta kilogram per tahun, dan menempati urutan ketiga setelah jahe dan kunyit (BPS, 2025). Kapulaga Jawa (*W. compacta*) tumbuh optimal pada ketinggian 300 – 400 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan yang relatif stabil sepanjang tahun (Suhartini *et al.*, 2021). Kapulaga Jawa (*W. compacta*) merupakan tanaman yang bersifat tahunan (perennial) dengan habitus berupa terna setinggi 1-1,5 m (Gambar 2.1a). Batangnya merupakan batang semu yang tersusun dari pelepah-pelepah daun, berbentuk silindris dan tumbuh tegak (Gambar 2.1b). Pangkal daun berbentuk runcing dengan panjang 25-35 cm dan lebar 10-12 cm, pertulangan daun menyirip dan berwarna hijau (Gambar 2.1c). Dalam satu rumpun tanaman, umumnya terdapat 2 – 5 batang semu yang tumbuh dari rizoma (Gambar 2.1d). Batang yang telah tua akan mati dan diganti oleh batang muda yang tumbuh dari rizoma baru.

Buah kapulaga tumbuh berkelompok dalam tandan kecil dan pendek yang menempel di atas tanah, setiap tandan dapat berisi 10-20 butir buah (Gambar 2.1e). Buahnya termasuk ke dalam buah sejati berbentuk hampir bulat telur dengan tiga alur membujur pada permukaan yang membagi buah menjadi tiga bagian. Ukurannya berdiameter sekitar 8-11 mm, dengan kulit buah berwarna kuning muda hingga kecoklatan. Setiap buah memiliki tiga ruang yang dipisahkan dengan sekat (septum) dan masing-masing ruang berisi dua deret biji berwarna cokelat kemerahan saat matang, berbentuk poligonal tumpul dan diselubungi selaput tipis berwarna putih, serta mengeluarkan aroma khas yang bersifat aromatik (Abdurahim *et al.*, 2022; Sukarsa *et al.*, 2024)



Gambar 2.1 Morfologi Kapulaga Jawa (*W.compacta*), a) Habitus; b) Batang; c) Daun; d) Rhizoma; dan e) Buah
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS, 2025), klasifikasi kapulaga Jawa adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Division : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Zingiberales
Family : Zingiberaceae
Genus : *Wurfbainia*
Species : *Wurfbainia compacta* (Sol. ex Maton) Skornick. & A.D Poulsen

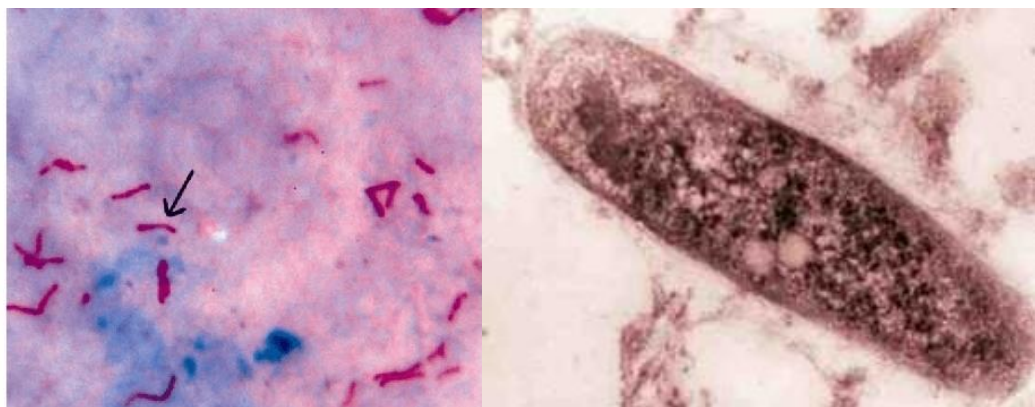
2.1.6.2 Senyawa Aktif Kapulaga Jawa (*W. compacta*)

Kapulaga Jawa (*W. compacta*) mengandung berbagai senyawa aktif yang berperan penting dalam aktivitas biologisnya. Hampir seluruh bagian tanaman kapulaga Jawa (*W. compacta*), termasuk biji, daun, dan batang mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri (Dang *et al.*, 2020; Ningsih *et al.*, 2023; Nurcholis *et al.*, 2021, 2022). Bagian biji kapulaga Jawa (*W. compacta*) merupakan sumber utama minyak atsiri yang kaya akan senyawa aktif. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Dang *et al.*, (2020), minyak atsiri biji kapulaga Jawa (*W. compacta*) mengandung komponen utama seperti 1,8-cineole, terpineol, α -borneol, geraniol, linalool, dan α -terpinyl acetate yang berperan dalam aktivitas inflamasi dan memberi aroma khas pada minyak atsiri. Selain itu, hasil analisis GC–MS yang dilakukan oleh Darsih *et al.*, (2023) terhadap minyak atsiri buah kapulaga Jawa (*W. compacta*) teridentifikasi sebanyak 23 senyawa dengan kandungan utama berupa 1,8-cineole, dan diikuti oleh β -pinene, α -terpineol, linalool, dan α -terpinyl acetate yang juga diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri yang kuat. Penelitian oleh Juliana *et al.*, (2022) juga berhasil mengidentifikasi 69 senyawa pada minyak atsiri biji kapulaga Jawa (*W. compacta*), terutama golongan terpenoid dan polifenol, serta 20 senyawa asam organik yang mendukung aktivitas antioksidan.

Selain pada bijinya, daun kapulaga Jawa (*W. compacta*) mengandung berbagai senyawa fenolik dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan alami. Hasil analisis GC-MS yang dilakukan oleh Arista & Nurcholis (2024), terhadap ekstrak daun kapulaga teridentifikasi 27 senyawa dengan komponen yang paling dominan berupa 1,8-cineole dan 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone yang berperan penting dalam menetralkan radikal bebas dan mendukung aktivitas biologis seluler. Sementara itu, bagian batang dan rimpang kapulaga Jawa (*W. compacta*) juga dilaporkan mengandung flavonoid dan fenolik yang berperan dalam aktivitas antioksidan.

2.1.7 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Macêdo *et al.*, 2022). Secara umum, *M. tuberculosis* berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul. Bakteri ini memiliki lebar 0,3 – 0,6 mm dan panjang 1 – 4 mm. *M. tuberculosis* termasuk ke dalam bakteri basil aerobik yang bersifat tahan asam (*acid-fast bacillus*) karena memiliki dinding sel kompleks yang kaya akan lipid. Lapisan dinding sel *M. tuberculosis* terdiri atas tiga komponen utama, yaitu peptidoglikan, arabinogalaktan, dan asam mikolat, yang tersusun membentuk struktur kompleks yang dikenal sebagai *mycolyl–arabinogalactan–peptidoglycan* (mAGP) *complex* (Gordon & Parish, 2018; H. Wang *et al.*, 2024). Peptidoglikan berfungsi menjaga bentuk dan kekuatan sel, sedangkan arabinogalaktan menghubungkan peptidoglikan dengan lapisan luar asam mikolat. Asam mikolat sendiri merupakan rantai panjang asam lemak (C₆₀–C₉₀) yang bersifat sangat hidrofobik. Keberadaan lapisan ini menyebabkan permeabilitas sel terhadap zat kimia sangat rendah, sehingga menyebabkan *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, serta tahan terhadap antibiotik atau disinfektan. Sifat tahan asam ini dapat diamati melalui pewarnaan Ziehl–Neelsen, di mana *M. tuberculosis* tampak sebagai basil merah cerah yang tidak kehilangan warna meskipun mengalami proses dekolorisasi dengan larutan *acid-alcohol* (gambar 2.2) (Dubey *et al.*, 2012).



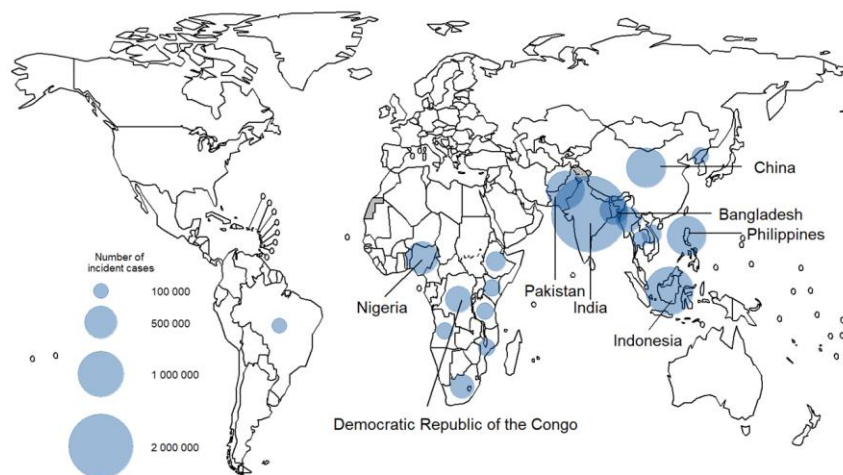
Gambar 2.2 Basil *Mycobacterium tuberculosis* berwarna merah pada pewarnaan Ziehl–Neelsen

Sumber: (Dubey *et al.*, 2012; Eflury, 2009)

Secara klinis, TB ditandai dengan gejala khas berupa batuk kronis berdahak lebih dari dua minggu, demam ringan yang cenderung meningkat pada sore atau

malam hari, penurunan berat badan, kelelahan, keringat malam, dan kadang disertai nyeri dada. Jika tidak segera ditangani, infeksi dapat menyebabkan kerusakan jaringan paru-paru yang luas dan menimbulkan komplikasi berat, termasuk penyebaran ke organ tubuh lain seperti tulang belakang, ginjal, otak, atau kulit (Aprilia¹ *et al.*, 2024; Fahdhienie *et al.*, 2024; Mohammadnabi *et al.*, 2024). Sebagian besar kasus TB menyerang paru-paru dan menular melalui inhalasi *droplet* yang keluar saat penderita batuk maupun bersin, namun juga dapat memengaruhi organ tubuh lain seperti kelenjar getah bening, ginjal, otak, tulang belakang, dan kulit melalui penyebaran bakteri di aliran darah atau sistem limfatik (Aprilia¹ *et al.*, 2024; Fahdhienie *et al.*, 2024; Mohammadnabi *et al.*, 2024). Penyakit ini termasuk dalam kategori penyakit infeksi yang masih menjadi tantangan besar kesehatan masyarakat dunia karena penularannya mudah, waktu laten yang panjang, dan meningkatnya kasus resistensi obat.

Secara epidemiologis, TB merupakan salah satu dari sepuluh penyakit penyebab kematian tertinggi di dunia. Berdasarkan laporan *Global Tuberculosis Report*, terdapat sekitar lebih dari 8 juta orang menderita TB setiap tahunnya dan jumlahnya terus meningkat sejak tahun 2021. Jumlah kasus baru yang dilaporkan pada tahun 2023 mencapai 8,2 juta orang. Sebanyak dua pertiga kasus dari total kasus TB di dunia terkonsentrasi di delapan negara, yaitu India, Indonesia, Cina, Filipina, Pakistan, Nigeria, Bangladesh, dan Republik Demokratik Kongo. Indonesia menempati peringkat kedua dengan estimasi kasus 387 per 100.000 penduduk menderita TB, sehingga termasuk ke dalam salah satu negara dengan beban TB tertinggi di dunia (WHO, 2024).



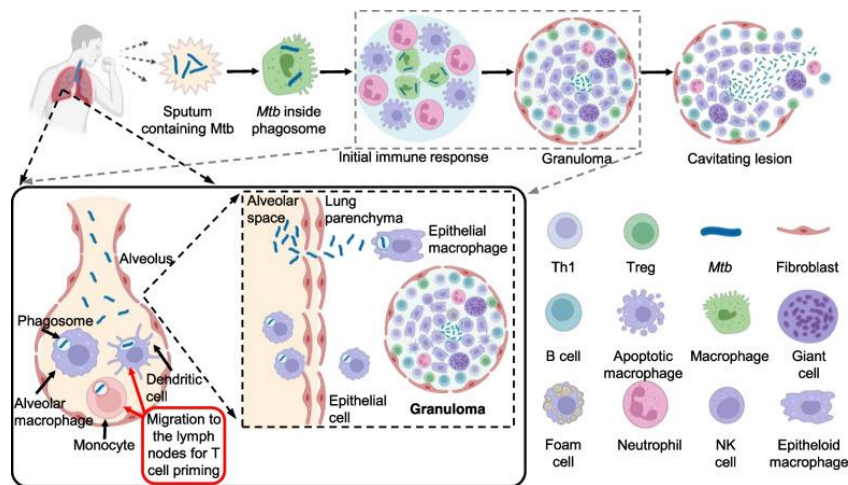
Gambar 2.3 Peta Penyebaran Kasus Tuberkulosis Global Tahun 2023
Sumber: *Global Report Tuberculosis*, WHO (2024)

Tingginya angka kejadian tuberkulosis di Indonesia tidak hanya disebabkan oleh infeksi *M. tuberculosis*, tetapi juga dipengaruhi oleh berbagai faktor risiko yang saling berhubungan. Faktor sosiodemografi seperti jenis kelamin, usia, tingkat pendidikan, status perkawinan, tingkat pendapatan, jenis pekerjaan, serta status gizi termasuk kedalam salah satu faktor yang memudahkan infeksi *M. tuberculosis* berkembang. Selain itu, faktor lingkungan seperti rumah padat, ventilasi buruk, dan kontak erat dengan penderita TB memperbesar kemungkinan penularan. Faktor perilaku lain seperti merokok dan tidak menjaga kebersihan diri juga memperburuk risiko perkembangan penyakit TB (Pralambang & Setiawan, 2021).

2.1.7.1 Mekanisme Infeksi Tuberkulosis

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) umumnya terjadi melalui inhalasi droplet yang mengandung *M. tuberculosis* saat penderita TB aktif batuk, bersin, atau berbicara. Setelah terhirup oleh individu sehat, bakteri mencapai alveolus paru dan bakteri ditelan oleh makrofag alveolar dan sel dendritik sebagai bagian dari respon imun awal tubuh. Namun, tidak seperti bakteri lain, *M. tuberculosis* mampu bertahan hidup di dalam sel fagosit dengan menghambat proses penghancuran di dalam fagosom, sehingga memungkinkan bakteri untuk berkembang biak secara bebas. Makrofag yang terinfeksi kemudian bermigrasi menuju kelenjar limfa, yang tidak hanya memicu aktivasi imunitas adaptif, tetapi juga memberi peluang bagi *M. tuberculosis* untuk menyebar ke bagian paru lainnya.

Ketika respon imun seluler mulai terbentuk, berbagai sel imun seperti monosit, makrofag, dan limfosit T berkumpul dan memicu pembentukan granuloma, yaitu kumpulan sel imun yang berfungsi untuk mengurung dan mengendalikan infeksi. Namun, pada individu dengan sistem imun lemah, seperti penderita HIV/AIDS, diabetes melitus, gizi buruk, atau lanjut usia, *granuloma* dapat pecah, sehingga bakteri menyebar dan menimbulkan infeksi aktif (Jaiswal *et al.*, 2025; Trajman *et al.*, 2025; Yan *et al.*, 2022).



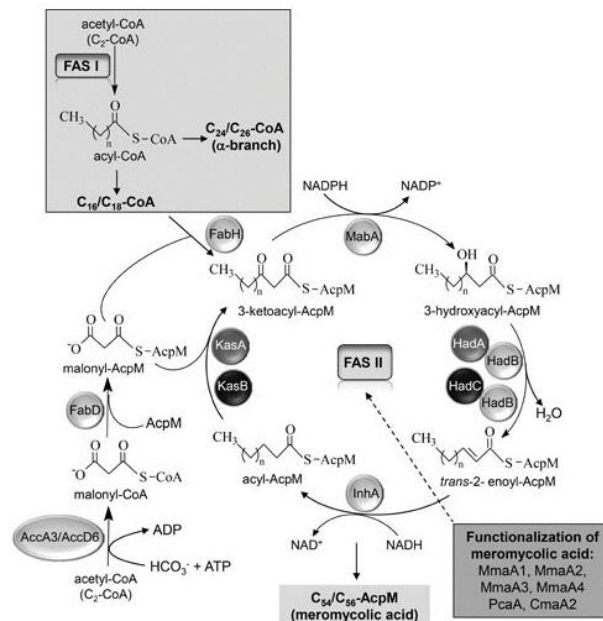
Gambar 2.4 Mekanisme infeksi *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: (Yan *et al.*, 2022)

2.1.7.2 Mekanisme Enzim InhA dalam Jalur Biosintesis Asam Mikolat

Keberhasilan pengobatan penyakit tuberkulosis bergantung pada efektivitas regimen obat yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis*. Regimen standar pengobatan yang direkomendasikan oleh WHO untuk kasus *drug-susceptible TB* melibatkan kombinasi obat lini pertama seperti isoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB), dan pirazinamid (PZA) selama 6–9 bulan. Tujuannya adalah untuk menekan pertumbuhan *M. tuberculosis* secara bersamaan serta mencegah terjadinya resistensi obat (WHO, 2024). Namun, pengobatan yang dilakukan dalam jangka panjang tersebut sering menimbulkan efek toksik dan menurunkan kepatuhan pasien, sehingga memicu munculnya kasus *Multidrug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB), yaitu bentuk TB yang resisten terhadap minimal dua obat lini pertama dan menjadi tantangan besar dalam upaya eradikasi TB (Nofianti *et al.*, 2024; Yan *et al.*, 2022).

Empat obat lini pertama pada penyakit TB memiliki mekanisme kerja dan target molekuler yang berbeda. Rifampisin (RIF) bekerja dengan menghambat *RNA polymerase β -subunit* yang berperan penting dalam proses transkripsi DNA menjadi RNA, sehingga menghambat sintesis protein bakteri. Etambutol (EMB) bekerja dengan target *arabinosil transferase* yaitu enzim yang berperan dalam sintesis arabinogalaktan, salah satu komponen dinding sel *M. tuberculosis*, sehingga melemahkan struktur dinding sel. Pirazinamid (PZA) merupakan prodrug yang diaktifkan oleh enzim *pirazinamidase* (*pncA*) di dalam bakteri menjadi pirazinoat, yang kemudian mengasamkan sitoplasma dan mengganggu stabilitas membran sel *M. tuberculosis*, terutama pada kondisi dorman atau pH rendah. Sementara itu, isoniazid (INH) bekerja dengan target jalur biosintesis asam mikolat yang merupakan salah satu komponen utama dinding sel *M. tuberculosis* yang berfungsi dalam menentukan virulensi dan ketahanan *M. tuberculosis* terhadap tekanan lingkungan serta berbagai agen antimikroba (Yan *et al.*, 2022).

Dalam fase awal infeksi, khususnya ketika *M. tuberculosis* memperbanyak diri di dalam makrofag, enzim *Enoyl-acyl carrier protein reductase* (*InhA*) memainkan peran penting dalam menjaga kelangsungan hidup bakteri. Enzim ini berfungsi dalam jalur biosintesis asam mikolat (Mostert *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2024). Asam mikolat disintesis melalui dua jalur utama yaitu sistem *Fatty Acid Synthase* tipe I (FAS-I) dan tipe II (FAS-II). Jalur FAS-I menghasilkan prekursor asam lemak jenuh dengan panjang rantai 14–26 atom karbon, sedangkan FAS-II memperpanjang prekursor tersebut untuk membentuk asam mikolat melalui aktivitas bertahap enzim *FabD*, *KasA/B*, *MabA*, *HadAB/BC*, dan *InhA*. Enzim *InhA* berperan pada tahap akhir jalur FAS-II dengan mereduksi 2-trans-enoil-ACP menjadi asil-ACP jenuh, yang digunakan untuk sintesis akhir asam mikolat (Tahiri *et al.*, 2020). Jalur biosintesis asam mikolat dan peran enzim *InhA* dalam sistem FAS-II disajikan pada gambar 2.5.

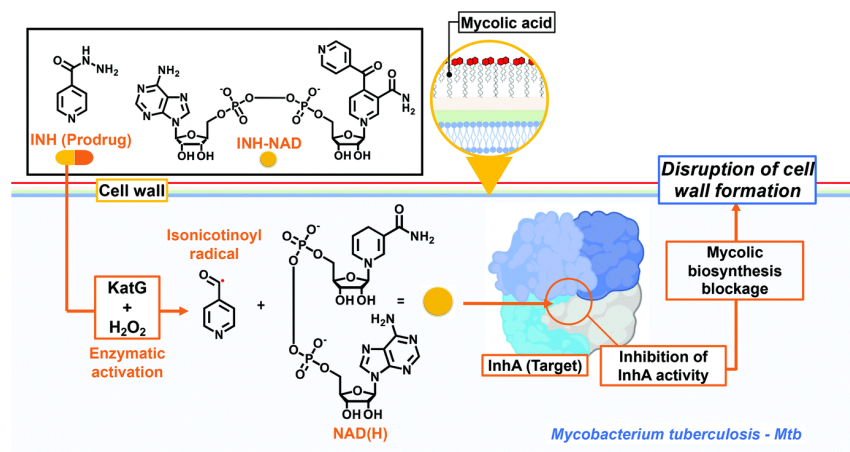


Gambar 2.5 Jalur biosintesis asam mikolat pada *Mycobacterium tuberculosis* melalui sistem *Fatty Acid Synthase* tipe I (FAS-I) dan tipe II (FAS-II)
Sumber: (Czyk & Kremer, 2014)

Sistem *Fatty Acid Synthase I* (FAS-I) menghasilkan prekursor asam lemak jenuh (C_{16} – C_{26}), sedangkan *Fatty Acid Synthase II* (FAS-II) memperpanjang rantai tersebut melalui serangkaian reaksi elongasi dan reduksi yang dikatalisis oleh enzim FabD, KasA/B, MabA, HadAB/BC, dan InhA. Tahap akhir yang dikatalisis oleh InhA menghasilkan asil-AcpM jenuh (C_{56}/C_{64} -AcpM) yang selanjutnya difungsionalisasi oleh kompleks MmaA dan PcaA menjadi asam meromikolat, prekursor utama pembentukan asam mikolat. Oleh karena itu, enzim InhA merupakan target molekuler yang sangat potensial dalam terapi antituberkulosis karena jalur FAS-II merupakan bagian esensial dalam metabolisme lipid *M. tuberculosis*, dan gangguan pada salah satu enzim di dalamnya dapat menghambat biosintesis asam mikolat serta melemahkan dinding sel bakteri (Czyk & Kremer, 2014).

Di antara keempat obat lini pertama, isoniazid (INH) memiliki aktivitas bakterisidal paling tinggi terhadap *M. tuberculosis* yang sedang aktif membelah dan menjadi komponen kunci dalam fase intensif pengobatan TB. INH merupakan prodrug yang memerlukan aktivasi oleh enzim *katalase-peroksidase* (KatG) untuk membentuk kompleks aktif *isonicotinyl-NAD* (NAD-INH). Kompleks ini

berikatan dengan enzim InhA pada jalur FAS-II, sehingga menghambat reduksi 2-*trans-enoil-ACP* menjadi asil-ACP jenuh. Penghambatan ini menyebabkan terhentinya proses biosintesis asam mikolat, yang mengakibatkan terganggunya integritas dinding sel, meningkatnya permeabilitas, dan bakteri tidak mampu mempertahankan struktur selnya sehingga bakteri mati. Mekanisme aktivasi dan kerja INH terhadap target enzim InhA disajikan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Mekanisme kerja Isoniazid (INH) dalam Menghambat Biosintesis Asam Mikolat pada *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: (Lopes *et al.*, 2020)

Namun, efektivitas INH mulai menurun akibat meningkatnya kasus resistensi obat. Salah satu mekanisme utama resistensi terhadap INH disebabkan oleh mutasi genetik pada gen *katG* yang mengode enzim katalase–peroksidase. Mutasi ini mengurangi atau meniadakan kemampuan enzim KatG dalam mengaktivasi INH menjadi bentuk aktifnya, sehingga kompleks NAD–INH tidak terbentuk dan penghambatan terhadap InhA gagal terjadi. Hal tersebut mengindikasikan perlunya pendekatan alternatif untuk menargetkan enzim InhA secara langsung, terutama melalui pencarian senyawa inhibitor baru melalui pendekatan komputasional.

2.1.8 Suplemen Bahan Ajar Biologi

Suplemen bahan ajar merupakan perangkat pendukung pembelajaran yang berfungsi untuk memperkaya, memperdalam, dan memperluas pemahaman terhadap konsep yang dipelajari agar proses pembelajaran menjadi efektif dan materi mudah dipahami (Nofianti *et al.*, 2024). Salah satu bentuk suplemen bahan

ajar yang efektif adalah *booklet*, yaitu media pembelajaran cetak yang bersifat ringkas, sistematis, dan menarik secara visual, sehingga materi bisa mudah untuk dipahami (Yudistira & Attifah, 2021). *Booklet* memiliki keunggulan dalam hal fleksibilitas, kemudahan dibawa, serta penyajian informasi yang sederhana namun padat, disertai ilustrasi yang memperjelas konsep biologi yang kompleks (Hafizah & Irianti, 2022).

Pengembangan suplemen bahan ajar berbasis hasil penelitian *in silico* senyawa aktif air sadapan batang kapulaga Jawa (*Wurfbainia compacta*) diarahkan untuk mendukung pembelajaran mahasiswa dalam memahami tahapan penelitian bioinformatika secara sistematis. Penelitian ini mencakup identifikasi senyawa aktif menggunakan GC–MS dan analisis *molecular docking*, fisikokimia, farmakokinetik, dan toksisitas menggunakan berbagai perangkat lunak dan *webserver* lain. Hasil penelitian tersebut kemudian akan dituangkan dalam bentuk *booklet* sebagai suplemen bahan ajar yang dapat digunakan dalam kegiatan pembelajaran atau praktikum mata kuliah Bioinformatika.

2.2 Hasil Penelitian yang Relevan

Adapun penelitian-penelitian sebelumnya yang relevan dengan penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Darsih *et al.*, (2023) melakukan analisis GC–MS terhadap minyak atsiri biji kapulaga Jawa (*W. compacta*) dan berhasil mengidentifikasi 23 senyawa, dengan komponen utama berupa 1,8-cineole, β -pinene, α -terpineol, linalool, dan α -terpinyl acetate. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang kuat dan mampu merusak struktur membran sel bakteri, hingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler, dan pada akhirnya menimbulkan kematian sel. Minyak atsiri *W. compacta* menunjukkan aktivitas antibakteri signifikan terhadap berbagai bakteri patogen, baik Gram positif maupun Gram negatif, termasuk *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*. Nilai konsentrasi hambat minimum (MIC) berkisar antara 1 hingga 2 mg/mL, dengan rasio MBC/MIC ≤ 4 yang mengindikasikan bahwa minyak atsiri kapulaga tidak hanya bersifat menghambat tetapi juga mampu membunuh bakteri secara efektif.

- 2) Juwitaningsih *et al.*, (2020) melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri dan antikanker dari ekstrak biji kapulaga (*W. compacta*) menggunakan pelarut aseton. Dalam studi tersebut, ekstrak diuji terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, dan *Enterococcus faecalis* menggunakan metode difusi cakram serta penentuan nilai MIC dan MBC. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antibakteri sedang terhadap *S. aureus* dan *S. mutans*, dengan nilai MIC masing-masing sebesar 312,5 µg/mL dan 625 µg/mL. Penelitian ini juga mengungkap bahwa kandungan metabolit sekunder seperti flavonoid, terpenoid, dan steroid dalam ekstrak berperan penting dalam mekanisme antibakteri, yaitu dengan merusak struktur membran sel bakteri dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler.
- 3) Rasyadi *et al.*, (2021) melakukan penelitian terhadap aktivitas antibakteri sabun mandi cair yang diformulasi menggunakan ekstrak etanol buah kapulaga (*W. compacta*) terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi agar. Penelitian ini menggunakan tiga variasi konsentrasi ekstrak, yaitu 2%, 4%, dan 6% yang masing-masing dimasukkan ke dalam formula sabun F1, F2, dan F3. Hasil pengujian menunjukkan bahwa seluruh formula memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong kuat, dengan diameter zona hambat rata-rata F1 ($22,33 \pm 0,85$ mm), F2 ($24,63 \pm 0,58$ mm), dan F3 ($25,80 \pm 0,17$ mm). Peningkatan konsentrasi ekstrak kapulaga berbanding lurus dengan peningkatan daya hambat terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri tersebut diduga disebabkan oleh kandungan senyawa aktif seperti saponin, flavonoid, terpenoid, dan senyawa fenolik yang mampu merusak membran sel bakteri, menghambat metabolisme, serta menyebabkan lisis sel mikroorganisme.
- 4) Patra *et al.*, (2020) melakukan studi *in silico* menggunakan pendekatan *molecular docking* untuk mengevaluasi beberapa senyawa turunan kapulaga terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa senyawa turunan kapulaga memiliki afinitas pengikatan yang baik terhadap target molekuler *M. tuberculosis*. Temuan tersebut menunjukkan

bahwa senyawa turunan kapulaga memiliki kemampuan berinteraksi dengan protein target *M. tuberculosis* melalui pendekatan *in silico*.

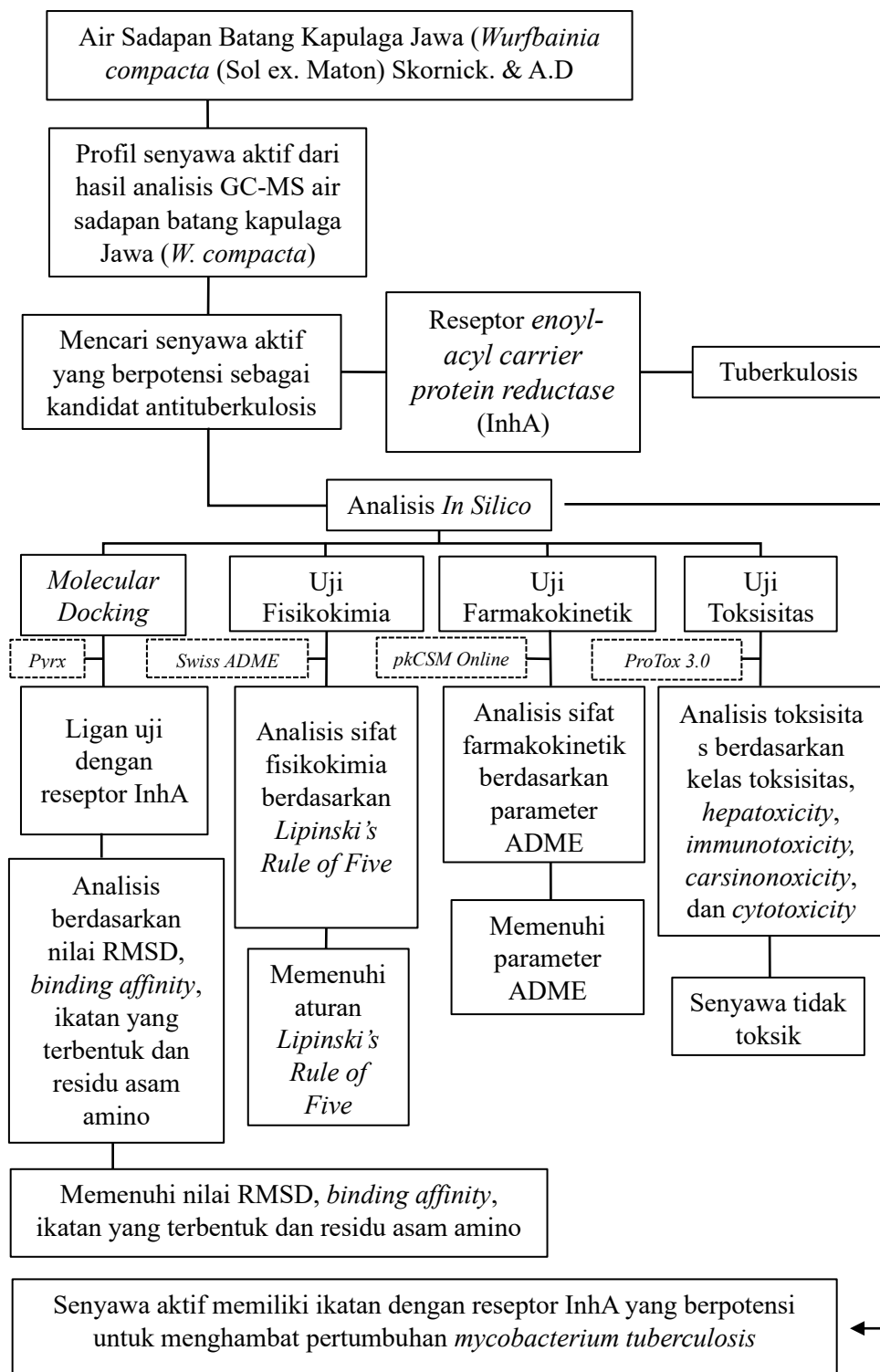
Berdasarkan berbagai hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif dalam kapulaga Jawa (*W. compacta*) memiliki potensi antibakteri melalui mekanisme gangguan pada stabilitas membran lipid bakteri. Mekanisme ini secara teoritis relevan terhadap bakteri dengan dinding sel kompleks seperti *Mycobacterium tuberculosis* yang kaya akan asam mikolat. Oleh karena itu, hasil-hasil penelitian tersebut dijadikan sebagai dasar ilmiah untuk menelusuri lebih jauh potensi dari air sadapan batang kapulaga Jawa (*W. compacta*), khususnya melalui pendekatan *molecular docking* terhadap target *M. tuberculosis*.

2.3 Kerangka Konseptual

Kapulaga Jawa (*W. compacta*) merupakan tanaman aromatik yang termasuk ke dalam famili Zingiberaceae dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai rempah dan obat tradisional. Bagian batang kapulaga Jawa (*W. compacta*) diketahui dapat menghasilkan air sadapan yang secara empiris digunakan masyarakat dalam meredakan gejala batuk dan menyegarkan tubuh. Aroma khas dari air sadapan ini mengindikasikan adanya senyawa volatil yang berpotensi memiliki aktivitas biologis. Namun, hingga saat ini penelitian ilmiah mengenai komposisi dan aktivitas senyawa aktif pada air sadapan batang kapulaga Jawa masih sangat terbatas.

Langkah awal penelitian ini dimulai dengan analisis data hasil identifikasi senyawa aktif air sadapan batang kapulaga Jawa (*Wurfbainia compacta* (Sol. ex Maton) Skornick. & A.D. Poulsen)) yang telah diperoleh melalui uji *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC–MS) di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Data hasil GC–MS tersebut digunakan untuk menentukan senyawa kandidat yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Tahapan berikutnya adalah analisis *in silico screening* yang mencakup proses *molecular docking*, analisis sifat fisikokimia, farmakokinetik, dan prediksi toksisitas. *Molecular docking* dilakukan menggunakan aplikasi *PyRx v0.8* untuk mengevaluasi interaksi antara ligan dan reseptor InhA. Kemudian visualisasi hasil

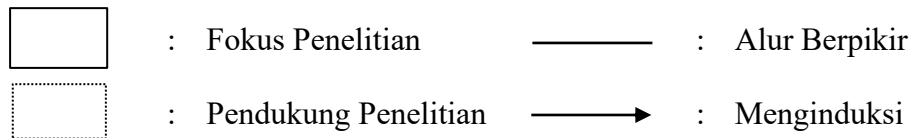
docking dilakukan menggunakan BIOVIA *Discovery Studio* 2024 untuk mengidentifikasi residu asam amino yang terlibat dalam interaksi antara ligan dan reseptor. Analisis lanjutan dilakukan untuk menilai sifat fisikokimia dan farmakokinetik menggunakan *SwissADME* dan *pkCSM-pharmacokinetics*. Analisis ini bertujuan untuk memperkirakan kemampuan senyawa aktif dalam proses penyerapan, distribusi, metabolisme, dan ekskresi di dalam tubuh. Tahap terakhir adalah prediksi toksisitas menggunakan *ProTox 3.0* untuk menilai keamanan penggunaan senyawa. Kerangka konseptual dalam penelitian ini disajikan pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Kerangka Konseptual Penelitian

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

Keterangan:



2.4 Pertanyaan Penelitian

- 1) Apakah senyawa aktif yang terkandung dalam air sadapan batang kapulaga Jawa (*W. compacta*) memiliki afinitas ikatan yang kuat terhadap enzim *Enoyl-acyl carrier protein reductase* (InhA) berdasarkan hasil analisis *molecular docking* secara *in silico*?
- 2) Apakah senyawa aktif air sadapan batang kapulaga Jawa (*W. compacta*) memenuhi karakteristik fisikokimia dan farmakokinetik yang sesuai dengan kriteria obat oral berdasarkan hasil prediksi menggunakan *SwissADME* dan *pkCSM-Pharmacokinetics*?
- 3) Apakah senyawa aktif air sadapan batang kapulaga Jawa (*W. compacta*) memiliki tingkat toksisitas yang aman berdasarkan hasil prediksi menggunakan *ProTox 3.0*?
- 4) Apakah hasil analisis *in silico* senyawa aktif air sadapan batang kapulaga Jawa (*W. compacta*) dapat dijadikan dasar penyusunan suplemen bahan ajar biologi berbasis bioinformatika?