

TELAAH *IN SILICO* DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA *SULFONYL-AMIDINE* TURUNAN PIPERIN SEBAGAI KANDIDAT ANTI-TB MDR

*IN SILICO STUDY AND ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF
PIPERINE-BASED SULFONYL AMIDINE AS ANTI-MDR TB CANDIDATE*

RESKY NUGRAHA

N012211023



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**TELAAH *IN SILICO* DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA *SULFONYL-AMIDINE*
TURUNAN PIPERIN SEBAGAI KANDIDAT ANTI-TB MDR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

RESKY NUGRAHA

N012211023

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**TELAAH IN SILICO DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA SULFONYL-AMIDINE
TURUNAN PIPERIN SEBAGAI KANDIDAT ANTI-TB MDR**

Disusun dan diajukan oleh

**RESKY NUGRAHA
N012211023**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanudddin

Pada tanggal 16 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19800101 200312 1 043

Pembimbing Pendamping



Prof. Dr. Sartini, M. Si., Apt
NIP. 19611111 198703 2 001



Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19800101 200312 1 043

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanudddin



Prof. Dr. Permat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Resky Nugraha

Nomor Mahasiswa : N012211023

Program Studi : Farmasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2023

Yang menyatakan



Resky Nugraha

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis senantiasa panjatkan kepada Allah swt. atas segala rahmat dan hidayah yang telah diberikan, sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini tepat pada waktunya. Tak lupa pula shalawat dan taslim kepada Rasulullah Muhammad SAW, sebagai teladan dan pembimbing kepada ilmu yang bermanfaat.

Tesis dengan judul "**Telaah *In Silico* dan Uji Aktivitas Senyawa *Sulfonyl-Amidine* Turunan Piperin Sebagai Kandidat Anti-TB MDR**" disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Farmasi pada Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari bahwa selama penyusunan tesis ini terdapat kendala dan hambatan, tetapi dengan bantuan dari berbagai pihak, tesis ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt., selaku komisi penasihat yang telah banyak memberi masukan, arahan, dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. Gemini Alam. M. Si., Apt., Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm, Ph.D., Apt., dan Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt., selaku tim komisi penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.

3. Dekan, Wakil Dekan, Kepala Prodi S2, Bapak-Ibu dosen, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana, dan memotivasi penulis dari awal memasuki bangku kuliah hingga saat ini.
4. Kedua orang tua penulis, Ayahanda Amir N., S.Pd. dan Ibunda Dra. St. Chadijah untuk semua doa, dukungan materil dan nonmateril, serta kasih sayang tulus yang telah dilimpahkan selama ini. Saudara-saudari penulis, Alfiani Fajrin, Wahyuni Amir, dan Muhammad Idhan Falid, untuk motivasi serta dukungan yang diberikan.
5. Para sahabat terbaik yang selalu hadir dan tanpa lelah memberi semangat kepada penulis, Sherina Saud, Henna Ayu Nibras, A. Rahma Raufia T, dan Alfiana Dwi Puspita. Serta rekan-rekan Magister Farmasi Angkatan 2021 yang telah banyak membantu. Semoga kesuksesan menyertai kita semua.
6. Seluruh laboran laboratorium dan staf akademik Fakultas Farmasi UNHAS.
7. Semua pihak yang terlibat, yang tidak sempat tersebut namanya.

Makassar, Februari 2023

Resky Nugraha

ABSTRAK

RESKY NUGRAHA, *Telaah In Silico Dan Uji Aktivitas Senyawa Sulfonyl-Amidine Turunan Piperin Sebagai Kandidat Anti-TB MDR (dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Sartini).*

Piperin merupakan senyawa bioaktif yang memiliki potensi sebagai kandidat senyawa anti-TB MDR. Salah-satu modifikasi molekuler untuk meningkatkan aktivitas biologis dan sifat fisikokimia piperin adalah pengembangan senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan kajian molekuler terhadap senyawa *sulfonyl-amidine* serta uji aktivitas antibakterinya pada strain H37Rv dan strain MDR.

Piperin, tiopiperin, dan 10 senyawa *sulfonyl-amidine* di-*docking* pada lima protein yang bertanggungjawab pada resistansi TB MDR menggunakan Chimera yang terhubung dengan Autodock Vina. Senyawa hasil *docking* kemudian digunakan untuk simulasi dinamika molekuler menggunakan NAMD. Selanjutnya dilakukan prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas pada semua senyawa uji menggunakan web berbasis jaringan. Adapaun uji aktivitas dilakukan pada senyawa terpilih menggunakan media cair dengan sistem BACTEC MGIT 960.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiopiperin serta senyawa turunan 5, 8, dan 10 memiliki hasil *docking* dan dinamika molekuler yang optimal. Berdasarkan prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas, piperin, tiopiperin, serta senyawa turunan 10 memiliki profil farmakokinetik yang lebih baik dibanding senyawa uji lainnya. Adapun hasil pengujian aktivitas antibakteri menggunakan piperin, tiopiperin, dan senyawa turunan 10 dengan konsentrasi 50 μM tidak menunjukkan efek penghambatan pertumbuhan pada *M. Tb* strain H37Rv dan TB MDR.

Kata kunci: piperin, molecular docking, molecular dynamic, anti-mikobakterial

ABSTRACT

RESKY NUGRAHA, In Silico Study and Antimycobacterial Activity Of Piperine-Based Sulfonyl Amidine as Anti MDR TB Candidate (supervised by Muhammad Aswad and Sartini).

Piperine is a potential bioactive compound and an anti-TB MDR candidate. The development of piperine-based sulfonyl-amidine is one of the molecular modifications used to increase the biological activity and physicochemical properties of piperine. This study aimed to conduct molecular studies of piperin-based sulfonylamidine and evaluate its antibacterial activity against H37Rv and MDR strains.

Using Chimera linked to Autodock Vina, piperine, thiopiperine, and ten piperin-based sulfonyl-amidines were docked to five proteins responsible for MDR-TB resistance. The docked compounds were then used for molecular dynamics simulations using NAMD. Furthermore, all compounds' physicochemical properties and toxicity were predicted using an online web server. The activity test was carried out on selected compounds using a liquid medium with the Bactec MGIT 960 system.

The results showed that thiopiperine and compounds 5, 8, and 10 have optimal docking and molecular dynamics evaluations. Based on predictions of physicochemical properties and toxicity, piperine, thiopiperine, and compound 10 had a better pharmacokinetic profile than the other tested compounds. Meanwhile, the results of the antibacterial activity test using piperine, thiopiperine, and compound 10 at 50 μ M concentration did not show a growth inhibitory effect on the H37Rv and MDR-TB strains.

Keywords: piperine, molecular docking, molecular dynamics, anti-mycobacterial

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Tuberkulosis	6
1. Inhalasi <i>M. tuberculosis</i>	7
2. Produksi sitokin pro-inflamasi	7
3. Kontrol pertumbuhan bakteri	8
4. Tuberculosis pasca-primer	9
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9

1. Sifat bakteri	10
2. Struktur dinding sel	11
C. Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR TB)	19
1. Resistansi ekstrinsik (<i>acquired drug resistance</i>)	21
2. Resistansi intrinsik (<i>innate drug resistance</i>)	25
D. Senyawa Piperin	27
E. Potensi Senyawa Piperin Sebagai Anti-TB MDR	28
F. Sintesis Senyawa Turunan Piperin	32
G. Media Kultur <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	34
1. Lowenstein Jensen	34
2. Ogawa	35
3. Middlebrook	35
H. Metode Deteksi Resistansi Obat Anti-Tuberkulosis	35
1. Metode proporsi (Konvensional)	35
2. Metode MGIT (Modern)	36
I. Kerangka Teori	37
J. Kerangka Konsep	38
K. Hipotesis	39
III. METODE PENELITIAN	40
A. Rancangan Penelitian	40
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	40
C. Instrumen dan Sumber Data	40
1. Instrumen yang digunakan	40
2. Data yang digunakan	40
D. Alat dan Bahan	41
1. Alat	41

2. Bahan	42
E. Metode Kerja	42
1. Telaah <i>in silico</i> senyawa <i>sulfonyl-amidine</i> turunan piperin	42
2. Pengujian aktivitas antibakteri	44
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	48
A. <i>Molecular Docking</i>	48
1. Validasi	49
2. Energi ikatan	50
3. Interaksi ligan	52
B. <i>Molecular Dynamic</i>	65
1. RMSD (<i>Root Mean Square Deviation</i>)	65
2. RMSF (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>)	70
C. Prediksi Drug-likeness, ADME, dan Toksisitas	73
1. <i>Drug-likeness</i>	73
2. Prediksi farmakokinetik	80
3. Prediksi toksisitas	91
D. Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>M. Tuberculosis</i>	95
V. PENUTUP	99
A. Kesimpulan	99
B. Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	113

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Hasil sintesis senyawa piperine-based <i>sulfonyl amidine</i>	33
2.	Tabel energi bebas ikatan dan RSMD hasil docking	51
3.	Tabel evaluasi <i>drug-likeness</i> senyawa <i>sulfonyl-amidine</i> turunan piperin berdasarkan SwissADME	75
4.	Tabel evaluasi <i>drug-likeness</i> senyawa <i>sulfonyl-amidine</i> turunan piperin berdasarkan ADMETlab 2.0	76
5.	Tabel Hasil Prediksi ADME menggunakan ADMETlab 2.0	80
6.	Tabel Hasil Prediksi ADME menggunakan pkCSM	81
7.	Tabel Hasil Prediksi Toksisitas menggunakan ADMETlab 2.0	91
8.	Tabel Hasil Prediksi Toksisitas menggunakan pkCSM	92
9.	Tabel Hasil Uji Hasil Uji Aktivitas Terhadap bakteri <i>M. tuberculosis</i>	97

DAFTAR GAMBAR

nomor		halaman
1.	Patogenesis infeksi <i>M.tuberculosis</i>	6
2.	Stuktur dinding sel <i>M. tuberculosis</i>	12
3.	Sintesis peptidoglikan	13
4.	Sintesis arabinogalaktan	15
5.	Sintesis asam mikolat	17
6.	Mekanisme aksi dan mekanisme resistensi INH	20
7.	Mekanisme aksi dan mekanisme resistensi rifampisin	22
8.	Mekanisme aksi dan mekanisme resistensi etambutol	23
9.	Stuktur piperin	29
10.	Skema sintesis senyawa <i>piperine-based sullfonyl amidine</i>	32
11.	Tumpang tindih antara ligan kristalografi (biru) dengan ligan hasil <i>redocking</i> (hijau)	48
12.	Perbandingan interaksi ligan antara kompleks INH-NAD dan senyawa turunan 9 pada protein 2ei0	53
13.	Jenis ikatan pada kompleks turunan 9 dan protein 2ie0	54
14.	Perbandingan ikatan hidrogen antara sorangicin dan senyawa turunan 8 pada protein 6vvz	57
15.	Interaksi Van der Waals senyawa turunan 3	58
16.	Interaksi Van der Waals senyawa turunan 5	58
17.	Ikatan hidrogen dan interaksi pi senyawa turunan 10	60
18.	Ikatan hidrogen turunan 4 dengan protein 7bvf	62
19.	Interaksi hidrofobik turunan 2 dengan protein 4zra	63
20.	Interaksi hidrofobik turunan 4 dengan protein 4zra	63

21.	Grafik RMSD protein 2ie0 dengan tiopiperin, senyawa 5, senyawa 8, dan senyawa 10	65
22.	Grafik RMSD protein 6vvz dengan tiopiperin, senyawa 5, senyawa 8, dan senyawa 10	65
23.	Grafik RMSD protein 4nng dengan tiopiperin, senyawa 5, senyawa 8, dan senyawa 10	66
24.	Grafik RMSD protein 7bfv dengan tiopiperin, senyawa 5, senyawa 8, dan senyawa 10	66
25.	Grafik RMSD protein 4zra dengan tiopiperin, senyawa 5, senyawa 8, dan senyawa 10	67
26.	Grafik Grafik RMSF protein 2ie0 dengan tiopiperin, senyawa turunan 5, senyawa turunan 8, dan senyawa turunan 10	69
27.	Grafik Grafik RMSF protein bbvz dengan tiopiperin, senyawa turunan 5, senyawa turunan 8, dan senyawa turunan 10	70
28.	Grafik Grafik RMSF protein 4nng dengan tiopiperin, senyawa turunan 5, senyawa turunan 8, dan senyawa turunan 10	70
39.	Grafik Grafik RMSF protein 7bvf dengan tiopiperin, senyawa turunan 5, senyawa turunan 8, dan senyawa turunan 10	71
30.	Grafik Grafik RMSF protein 4zra dengan tiopiperin, senyawa turunan 5, senyawa turunan 8, dan senyawa turunan 10	71
31.	Radar bioavailabilitas senyawa turunan 3, 6, 8, dan 9	77
32.	Parameter sifat fisikokimia senyawa turunan 3, 6, 8, dan 9	78
33.	Parameter sifat fisikokimia OAT lini 1	79
34.	Parameter sifat fisikokimia senyawa turunan 10	80
35.	BOILED-egg senyawa turunan 3, 8, dan 9	84
36.	BOILED-egg piperin, tiopiperin, dan senyawa turunan 10	87
37.	Situs metabolisme piperin dan tiopiperin	89

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
Lampiran 1. Skema kerja	113
Lampiran 2. Visualisasi Interaksi Ligan dan Asam Amino	116
Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi Senyawa Uji	126

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
Å	Ångström
g	Gram
HIA	Human Intestinal Absorbtion
INH	Isoniazid
KHM	Konsentrasi Hambat Minimum
L	Liter
LJ	Löwenstein Jensen
mg	Miligram
mL	Mililiter
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromolar
ns	Nanosekon
MDR	Multidrug-resistant Tuberculosis
MGIT	Mycobacterium Growth indicator Tube
PZA	Pirazinamid
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SM	Streptomisin
TCM	Tes Cepat Molekuler
XDR-TB	Extensively Drug Resistant Tuberculosis

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tuberkulosis merupakan infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan menjadi salah satu penyebab utama kematian dari penyakit menular. Indonesia menempati peringkat kedua sebagai kontributor terbesar peningkatan kasus tuberkulosis di dunia pada tahun 2020 dan termasuk dalam daftar negara dengan beban tinggi (*high burden countries*) periode 2021–2025 dengan tingkat keberhasilan pengobatan TB MDR di bawah 50% (WHO, 2021). Hal ini disebabkan oleh penggunaan antibiotik lini kedua yang lebih kompleks, memiliki efek samping yang besar, dan membutuhkan durasi pengobatan lebih lama daripada antibiotik lini pertama (Kibret *et al.*, 2017; WHO., 2019; Mirzayev *et al.*, 2021).

Multidrug-Resistant Tuberculosis (TB MDR) didefinisikan sebagai TB yang resistan setidaknya terhadap isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF) (Bastos *et al.*, 2017). Resistansi ini dapat terjadi karena faktor ekstrinsik (*acquired drug resistance*) dan faktor intrinsik (*innate drug resistance*). Resistansi ekstrinsik disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi enzim yang menjadi target kerja

dari isoniazid, rifampisin, dan obat anti-tuberkulosis lainnya karena ketidakpatuhan pasien terhadap rejimen obat. Sementara resistansi intrinsik terjadi karena evolusi dari *M. tuberculosis* (Liu *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2020; Iacobino *et al.*, 2020; Ayanwale *et al.*, 2020).

Salah satu senyawa bioaktif yang dapat dikembangkan dalam penemuan obat anti-TB MDR adalah piperin, komponen utama dari tanaman lada (*Piper nigrum*, L.). Piperin menunjukkan efek penghambatan pada pertumbuhan *M. tuberculosis* yang resistan terhadap isoniazid dengan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) jauh lebih kecil dibanding ekstrak etanol lada hitam (Hamka., 2018). Sementara kombinasi piperin dengan rifampisin dilaporkan dapat menurunkan KHM dari rifampisin dan mencegah resistansi silang dengan berikatan pada situs lain dari RNA polimerase (Hegeto *et al.*, 2019; Synergism, 2019). Selain itu, beberapa penelitian terbaru menunjukkan aktivitas piperin pada *strain* TB MDR melalui penghambatan pompa efluks (Tiwari *et al.*, 2020; Sieniawska *et al.*, 2020; Sarangi *et al.*, 2021).

Piperin memiliki lipofilisitas yang rendah dan sukar diabsorpsi di saluran cerna sehingga penggunaannya masih terbatas (Ezawa *et al.*, 2016; Tiwari *et al.*, 2020; Imam *et al.*, 2021). Piperin juga mudah terisomerisasi ketika terkena sinar ultraviolet sehingga harus terlindungi dari cahaya (Ezawa *et al.*, 2016). Maka, diperlukan optimasi senyawa turunan piperin untuk memperbaiki sifat fisikokimia serta memberikan efikasi tinggi pada TB MDR.

Studi molekuler dan sintesis senyawa turunan piperin telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh (Dubey., 2017) menunjukkan peranan cincin metilendioksifenil dan rantai karbon terkonjugasi untuk aktivitas piperin. (Philipova *et al.*, 2018) melakukan modifikasi pada bagian amida dan mensintesis senyawa turunan piperin amida yang memiliki aktivitas lebih baik dibanding etambutol dan isoniazid. Perubahan pada gugus amida juga dapat menyebabkan perubahan energi molekul yang akan mempengaruhi kelarutan piperin (Ezawa *et al.*, 2021).

Salah-satu modifikasi struktur yang saat ini dapat dilakukan untuk meningkatkan aktivitas piperin sebagai kandidat anti-TB MDR adalah penambahan gugus *sulfonyl-amidine* pada posisi amida berdasarkan metode *coupling reaction* antara tioamida dan sulfonil azida (Aswad *et al.*, 2013). Sintesis senyawa turunan piperin dengan penambahan gugus *sulfonyl-amidine* pada posisi amida berhasil meningkatkan aktivitas piperin sebagai antikanker (Aswad & Rifai, 2019). Selain itu, senyawa *benzene sulfonyl-amidine* turunan piperin juga memiliki stabilitas yang lebih baik terhadap asam, basa, dan peroksida (Hikma *et al.*, 2021; Aswad *et al.*, 2022).

Pada penelitian ini, senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin akan ditelaah secara *in silico* melalui *molecular docking* dan *molecular dynamic* terhadap beberapa protein target. Senyawa terpilih akan disintesis dan diuji aktivitasnya terhadap *M. tuberculosis* secara *in vitro*.

A. Rumusan Masalah

1. Bagaimana afinitas dan model interaksi senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin dengan beberapa protein target penyebab resistansi *M. tuberculosis*?
2. Bagaimana prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin?
3. Bagaimana hasil pengujian aktivitas anti-bakteri senyawa turunan piperin terhadap bakteri TB MDR?

B. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui afinitas dan model interaksi senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin dengan beberapa protein target penyebab resistansi *M. tuberculosis* berdasarkan simulasi *molecular docking* dan *molecular dynamic*.
2. Mengetahui prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin.
3. Melakukan pengujian aktivitas senyawa hasil sintesis terhadap *strain* bakteri TB MDR.

C. Manfaat Penelitian

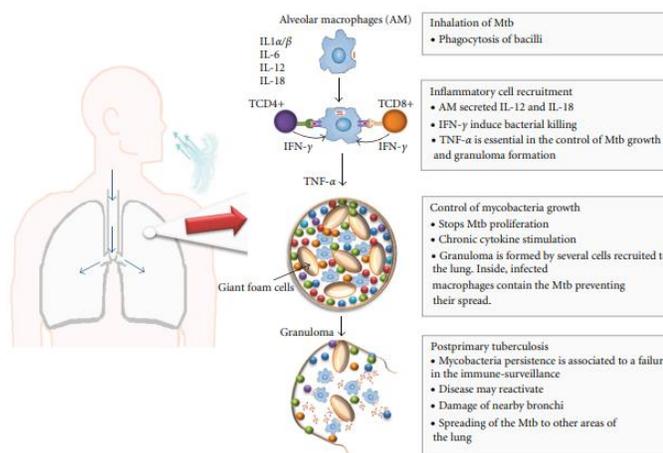
Penelitian ini dapat menjadi acuan pengembangan obat anti-TB MDR melalui prediksi *in silico* serta uji aktivitas anti-bakteri. Diharapkan senyawa turunan piperin yang disintesis dapat menjadi kandidat obat baru dalam upaya penurunan resistansi anti-bakteri khususnya pada TB MDR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini memiliki ukuran partikel yang kecil dengan diameter 1-5 mikron. *M. tuberculosis* dapat bertahan di udara selama beberapa menit hingga beberapa jam dan ditularkan oleh penderita TB ketika batuk, bersin, atau berbicara. *M. tuberculosis* yang masuk ke paru-paru akan menginduksi mediator imun dan mendorong terjadinya kavitas dan fibrosis yang dapat menyebabkan obstruksi aliran udara dan gangguan ventilasi restriktif (Sakamoto, 2012; Ravimohan *et al.*, 2018).



Gambar 1. Patogenesis infeksi *M. tuberculosis* (Zuiga *et al.*, 2012)

1. Inhalasi *M. tuberculosis*

Patogenesis dari penyakit tuberkulosis dimulai dari proses inhalasi. Droplet yang terhirup melalui saluran pernapasan sebagian besar terperangkap oleh lendir yang disekresikan sel goblet untuk menghalangi masuknya benda asing. Sementara sebagian basil yang berhasil melewati sistem pertahanan mukosiliar pertama tersebut mencapai paru-paru bagian atas dan mengaktifasi makrofag alveolar (Zuiga *et al.*, 2012; Ravimohan *et al.*, 2018).

Makrofag alveolar dapat melakukan fagositosis pada basil mikobakteri dengan beberapa reseptor fagositik. Ligasi reseptor Fc (FcR) menyebabkan produksi oksigen intermediet reaktif (ROI) dan fusi lisosom, sedangkan ligasi reseptor komplemen 3 (CR3) atau reseptor mannosa (MR) menghambat *respiratory burst* dan mencegah pematangan fagosom. Sementara ligasi sel pembunuh alami (NK) melalui reseptor NKp46 akan melisis makrofag yang terinfeksi dan menginduksi sitokin pro-inflamasi (Zuiga *et al.*, 2012; Sakamoto, 2012; Ravimohan *et al.*, 2018; Luies & Preez, 2020).

2. Produksi sitokin pro-inflamasi

Basil yang dapat bertahan hidup dan berkembang dalam makrofag alveolar dan sel dendritik akan menginduksi mediator imun seperti TNF- α , IL-6, IL-12p80, IL-1 α , dan IL-1 β . TNF- α diproduksi oleh monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag efektor. IFN- γ diproduksi oleh sel T CD4⁺ dan

T CD8⁺ serta oleh sel NK. Sementara IL-12 dan IL-18 dihasilkan oleh makrofag alveolar dan sel dendritik yang terinfeksi (Sakamoto, 2012; Zuiga *et al.*, 2012).

Sitokin dan kemokin pada inflamasi paru-paru yang disebabkan oleh proliferasi *M. tuberculosis* akan mendorong lebih banyak leukosit ke tempat infeksi. Neutrofil dan monosit yang mampu menembus kapiler akan memfagosit bakteri dan mengeluarkan lebih banyak sitokin dan kemokin kemudian membentuk granuloma. Sel dendritik juga memfagositosis *M. tuberculosis* dan bermigrasi ke kelenjar getah bening untuk mempresentasikan antigen mikobakteri ke limfosit (Sakamoto, 2012; Zuiga *et al.*, 2012).

3. Kontrol pertumbuhan bakteri

Fase ini ditandai dengan penghambatan proliferasi *M. tuberculosis* dengan pembentukan granuloma akibat stimulasi sitokin yang menyebabkan makrofag berdiferensiasi menjadi sel epiteloid yang menyatu. Granuloma terdiri dari agregasi sel T dan makrofag terinfeksi yang mengandung *M. tuberculosis* untuk mencegah penyebarannya. Namun demikian, granuloma juga dapat memberikan mikobakterium ruang untuk bereplikasi dan bertahan hidup. Granuloma menunjukkan permeabilitas terhadap obat sehingga dapat mengurangi efikasi obat pada bakteri dalam granuloma (Zuiga *et al.*, 2012; Ferluga *et al.*, 2020).

Infeksi dalam granuloma dapat berkembang menjadi infeksi stabil yang dikenal dengan istilah laten. 5-10% orang dengan TB laten yang berkembang menjadi TB akut karena ketidakmampuan sistem kekebalan adaptif untuk mengatasi infeksi yang terjadi. Sebaliknya, pada orang dengan kekebalan bawaan yang kuat, infeksi laten akan tetap berada pada granuloma (Zuiga *et al.*, 2012; Ferluga *et al.*, 2020).

4. Tuberkulosis pasca-primer

Persistensi mikobakteri dan menurunnya sistem imun dapat menyebabkan infeksi laten kembali aktif, menginduksi kerusakan bronkus di sekitarnya, dan menyebarkan *M. tuberculosis* ke area lain di paru-paru (Zuiga *et al.*, 2012).

A. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis adalah jenis galur dari *M. tuberculosis* kompleks (MTBC), kelompok mikobakteri patogen yang menyebabkan TB pada mamalia, termasuk *M. africanum*, serta strain yang diadaptasi dari hewan seperti *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungii*, *M. caprae* dan *M. bovis* (Gordon & Parish, 2018).

Berikut taksonomi dari *M. tuberculosis* secara lengkap : (Gordon & Parish, 2018)

Filum : Actinobacteria

Kelas : Actinobacteria

Ordo : Actinomycetales

Famili : Mycobacteriaceae

Genus : Mycobacterium

Spesies: *Mycobacterium tuberculosis*

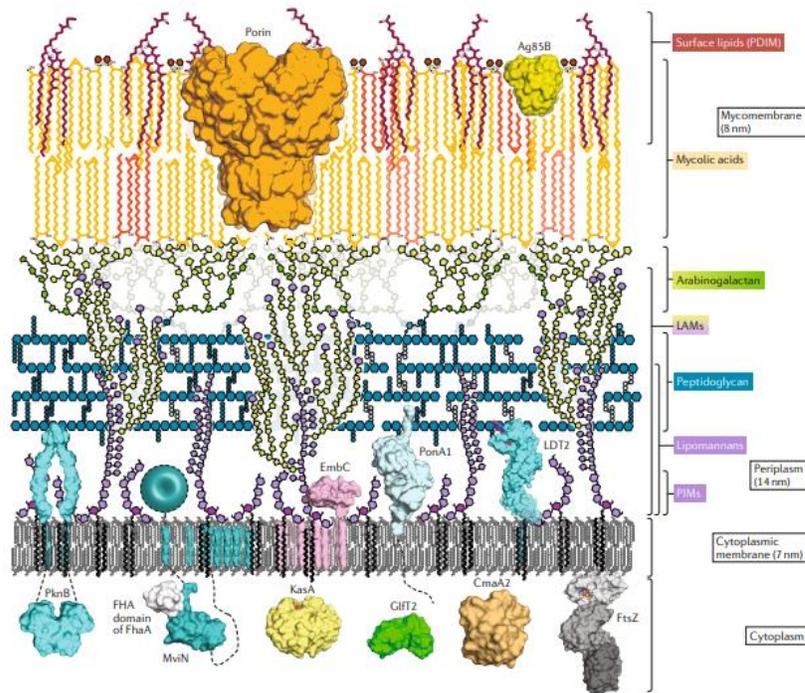
1. Sifat bakteri

M. tuberculosis adalah basil aerob yang tumbuh lambat, bersifat kemoorganotrofik, tidak bergerak, dan tidak membentuk spora. Di bawah kondisi laboratorium yang optimal pada suhu 37° C, *M. tuberculosis* berlipat ganda setiap 24 jam dan membutuhkan waktu sekitar 3 minggu untuk membentuk koloni kasar berwarna pucat pada cawan agar. Koloni ini divisualisasikan melalui pewarnaan tahan asam Ziehl-Neelsen, di mana dinding selnya yang tebal dan berlilin mempertahankan noda karbol-fuscin dari pencucian asam-alkohol. Tes biokimia, termasuk niasin positif dan kemampuan untuk mereduksi nitrat digunakan untuk membedakannya dari mikobakteri lain, meskipun dalam banyak kasus telah digantikan oleh analisis lokus genetik spesifik berbasis PCR (Gordon & Parish, 2018).

Ciri khas *M. tuberculosis* adalah tingkat pertumbuhannya yang lambat. Sementara alasan metabolisme yang mendasari pertumbuhannya yang lambat tidak sepenuhnya dipahami, tetapi kemungkinan karena *M. tuberculosis* hanya memiliki satu operon rRNA dan memerlukan sintesis dinding sel yang kompleks (Gordon & Parish, 2018).

2. Struktur dinding Sel

Selubung pelindung pada *M. tuberculosis* terdiri dari membran sitoplasma, dinding sel, lipid permukaan, dan kapsul yang diisi oleh banyak protein. Membran sitoplasma mengandung lipopolisakarida seperti *phosphatidylinositol mannosides* (PIMs), lipomannan (LMs) dan lipoarabinomannan (LAMs). Inti dinding sel mengandung lapisan peptidoglikan dan arabinogalaktan. Sementara dinding sel bagian luar mikobakteri tersusun atas asam mikolat dan lipid permukaan yang menjadi penghalang bagi antibiotik. Di bagian luar membran terdapat kapsul, matriks glukon, dan protein yang disekresikan untuk interaksi inang dan virulensi (Batt *et al.*, 2020).



Gambar 2. Struktur dinding sel *M. tuberculosis* (Boutte, 2019.)

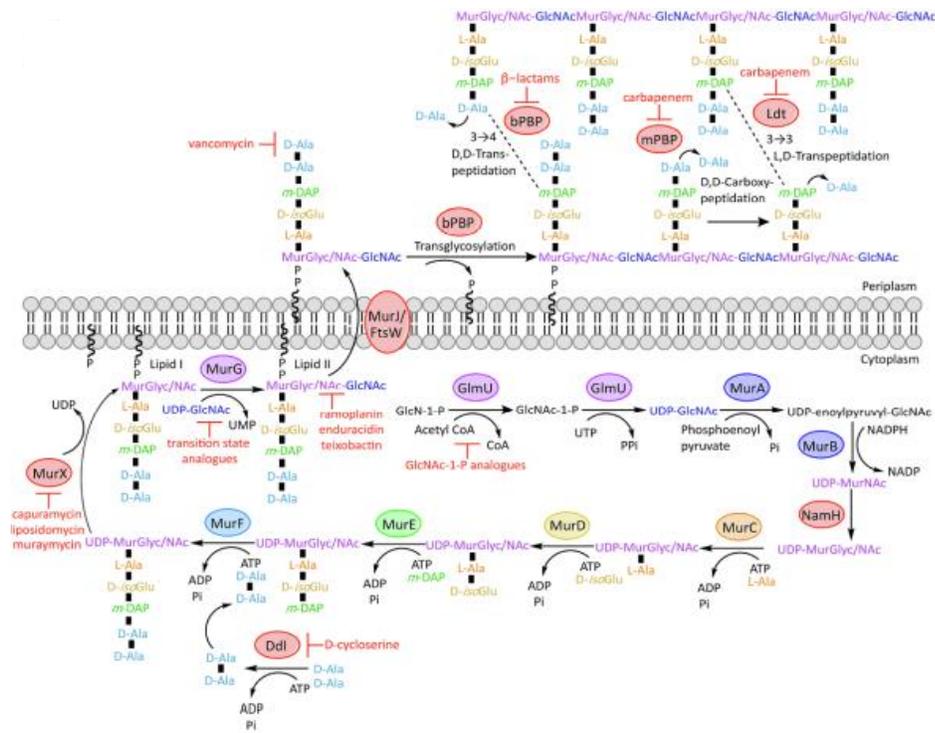
a. Sitoplasma mikobakteri.

Membran sitoplasma bakteri mengandung lipid membran pada umumnya yaitu gliserofosfolipid, juga mengandung *phosphatidylinositol mannosides* (PIMs), lipomannan (LMs) dan lipoarabinomannan (LAMs). (Boutte, 2019).

b. Peptidoglikan.

Peptidoglikan berfungsi mempertahankan bentuk sel dan membentengi membran plasma terhadap tekanan osmotik sitoplasma. Lapisan ini terdiri dari untai asam N-asetilmuramat linier dan gula N-asetilglukosamin (GlcNAc)

yang diikat silang oleh peptida membentuk struktur sarang lebah berlapis. Pada mikobakteri, peptidoglikan membentuk dasar untuk seluruh kompleks membran luar mikobakteri (Boutte, 2019; Vincent *et al.*, 2018).



Gambar 3. Sintesis peptidoglikan (Batt *et al.*, 2020)

Biosintesis peptidoglikan dimulai dalam sitoplasma oleh enzim asetiltransferase GlmU yang berperan dalam sintesis uridin difosfat-N-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc) melalui dua langkah. Pertama, transfer gugus asetil dari asetil-koenzim A ke glukosamin-1-fosfat, menghasilkan N-asetilglukosamin-1-fosfat. Kedua, modifikasi oleh uridiltransferase menjadi UDP-GlcNAc (Batt *et al.*, 2020).

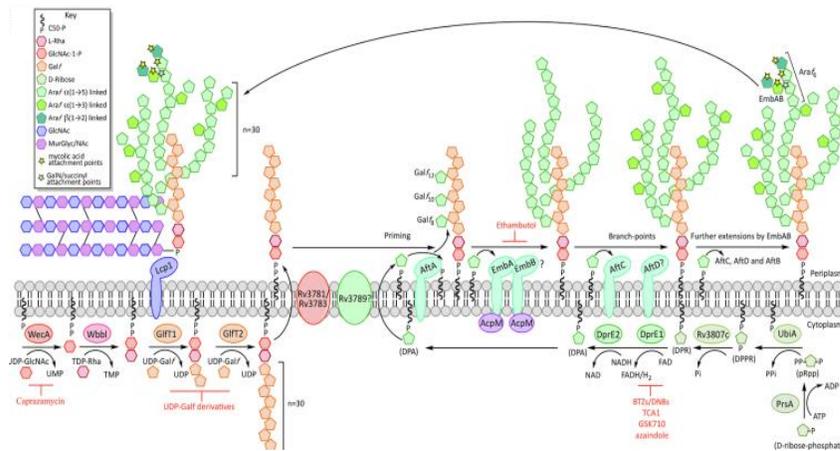
UDP-GlcNAc selanjutnya diubah menjadi UDP-MurNAc oleh enzim UDP-GlcNAc *enolpyruvyl transferase* (MurA) dan UDP-N-*acetylenolpyruvylglucosamine reductase* (MurB). MurA mentransfer *enolpiruvate* dari *phosphoenolpyruvate* ke UDP-GlcNAc, membentuk UDP-N-*acetylenolpyruvylglucosamine*. Selanjutnya MurB mereduksi gugus enolpiruvat menggunakan kofaktor NADPH, menjadi UDP-MurNAc (Batt *et al.*, 2020).

Rantai samping penta-peptida ditambahkan ke UDP-MurGlyc/NAc oleh ligase MurC, MurD dan MurE yang mengikat L-Ala, D-isoGlu, dan m-DAP secara berurutan. Rantai samping terakhir ditambahkan oleh MurF yang mengikat subunit dipeptida D-Ala:D-Ala, membentuk unit muramil-pentapeptida yang kemudian ditambatkan ke membran bagian dalam oleh MurX dan menjadi Lipid I. Enzim glikosiltransferase kemudian mengubah Lipid I menjadi Lipid II oleh MurG dengan mentransfer UDP-GlcNAc ke residu asam muramat dari Lipid I. Langkah terakhir, lipid II ditranslokasikan melintasi membran dalam ke periplasma oleh MurJ dan FtsW (Batt *et al.*, 2020).

c. Arabinogalaktan

Lapisan tengah inti dinding sel terbuat dari gula arabinogalaktan, polisakarida bercabang yang terdiri dari residu arabinosa (Araf) dan galaktosa (Galf) dalam konfigurasi furanosa. Polimer arabinogalaktan terhubung ke peptidoglikan dengan adanya *rhamnose*-GlcNAc, di mana GlcNAc menempel

pada residu asam N-asetilmuramat dalam peptidoglikan dan ramnosa berikatan dengan galaktan (Vilch, 2020; Batt *et al.*, 2020).



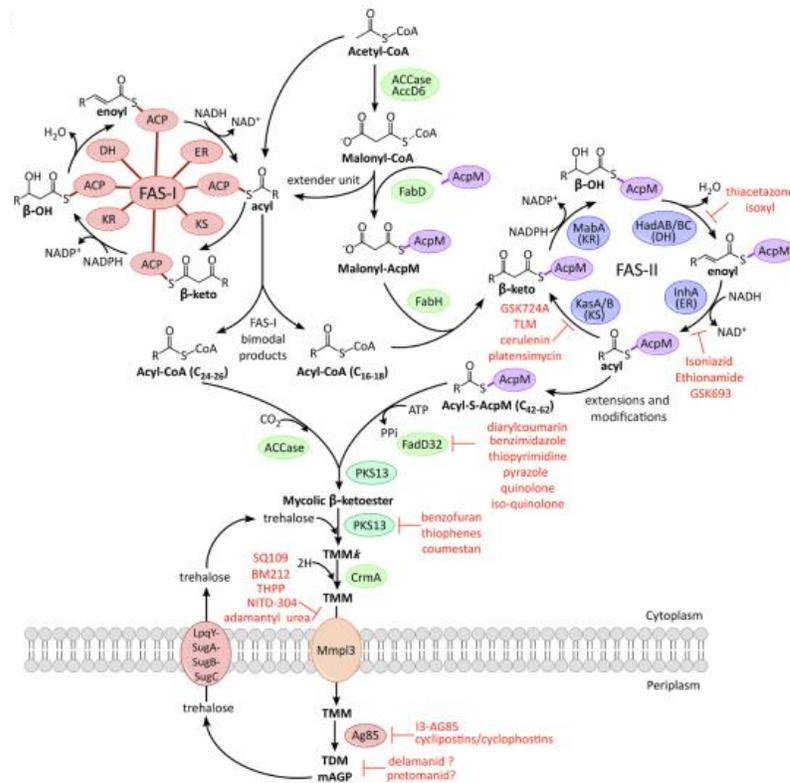
Gambar 4. Sintesis arabinogalaktan (Batt *et al.*, 2020)

Biosintesis arabinogalaktan dimulai di sitoplasma dengan sintesis unit penghubung *rhamnose*-GlcNAc oleh enzim transferase WecA yang membentuk C50-P-P-GlcNAc, dilanjutkan dengan penambahan L-ramnosa oleh enzim WbbL. Unit ramnosa-GlcNAc yang dihasilkan ditautkan ke membran dalam oleh dekaprenil-fosfat dengan gugus gula mengarah ke sitoplasma. Rantai galaktan disusun dengan polimerasi 2 UDP-Galf oleh *galactofuranose transferase* GlfT1, dilanjutkan dengan polimerasi sekitar 28 residu Galf oleh GlfT2. Domain galaktan, C50-P-P-N *acetylglucosamine*-L-*rhamnose*-*galactofuranose*₃₀ kemudian diangkut ke periplasma oleh Rv3781 dan Rv3783 (Batt *et al.*, 2020).

Domain arabinan ditambahkan ke domain galaktan oleh *arabinofuranosyl transferase* (AraT) dengan substrat donor lipid *decaprenylphosphoryl- β -D-arabinofuranose* (DPA) yang disintesis di dalam sitoplasma dari D-ribosa fosfat. Bagian utama arabinan kemudian dibangun oleh kombinasi AraT yang berbeda membentuk struktur dengan rantai lurus dan bercabang yang dimulai dengan polimerasi oleh heterodimer EmbA dan EmbB, target kerja dari etambutol. Domain ini akan berikatan dengan asam mikolat membentuk *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan* (mAGP) kompleks (Vilch, 2020; Batt *et al.*, 2020).

d. Asam mikolat

Mikomembran terdiri dari lipid, glikolipid, dan protein. Lapisan luarnya sebagian besar terdiri dari asam mikolat yang bebas atau berikatan pada gula trealosa untuk membuat trealosa-monomikolat (TMM) atau trealosa-dimikolat (TDM). Lapisan bagian dalam terbuat dari asam mikolat yang terikat secara kovalen pada arabinogalaktan. Mikomembran yang bersifat hidrofobik menyebabkan impermeabilitas selubung mikobakteri bagi beberapa antibiotik, yaitu 100-1000 kali kurang permeabel terhadap antibiotik β -laktam dibandingkan dengan selubung bakteri gram negatif. Mikomembran juga menjadi target kerja dari beberapa obat anti-TB lini pertama dan lini kedua termasuk isoniazid (Vincent *et al.*, 2018).



Gambar 5. Sintesis asam mikolat (Batt *et al.*, 2020)

Asam lemak sintase-I (FAS-I) merupakan enzim spesifik *M. tuberculosis* yang mampu mensintesis asam lemak secara *de novo*. FAS-I meliputi asil transferase (AT), enoil reduktase (ER), dehidratase (DH), malonil/palmitoil transferase (MPT), protein pembawa asil (ACP), keto-reduktase (KR) dan ketoasil sintase (KS) (Boutte,2019).

Sintesis dimulai dengan transfer asetat dari Koenzim A (CoA) ke domain ACP, dilanjutkan dengan pemanjangan rantai dengan penambahan dua karbon pada setiap siklus melalui karboksilasi asetil-KoA oleh kompleks asil-

KoA karboksilase (ACCase). Pemanjangan rantai siklus FAS-1 menghasilkan dua jenis asam lemak dengan panjang rantai berbeda yaitu C₂₄-C₂₆ dan C₁₆-C₁₈ (Boutte, 2019).

Rantai C₁₆-C₁₈ memasuki siklus FAS-II dan mengalami beberapa reaksi untuk pemanjangan rantai. Pertama, ACP sintetase, memindahkan rantai asil-CoA C₁₆-C₁₈ dari FAS-I ke FAS-II melalui kondensasi dengan malonil-AcpM. β -ketoacyl-AcpM yang dihasilkan kemudian mengalami reduksi pada gugus keto oleh keto-reduktase MabA untuk membentuk β -hidroksiasil-AcpM. Heterodimer dehidratase HadAB dan HadBC selanjutnya mengubah β -hidroksiasil-AcpM menjadi *enoyl*-AcpM, yang kemudian direduksi menjadi asil-AcpM oleh enzim *enoyl*-CoA reduktase InhA. Pemanjangan rantai kemudian dilanjutkan oleh sintase β -ketoasil KasA/B. FAS-II memperpanjang rantai asil dengan hasil akhir C₄₂-C₆₂ dan menghasilkan rantai *meromycolate* (Boutte, 2019).

Tahap selanjutnya ada penggabungan dua rantai asam lemak dari FAS-1 dan FAS-2 melalui kondensasi Claisen oleh yang enzim Pks13 dengan bantuan FadD32 dan ACCase. FadD32 mengaktifkan *meromycolyl*-AcpM menjadi *meromycolyl*-AMP dan menghubungkan rantai asil acyl-S-AcpM (C₄₂-C₆₂) ke ACP terminal-N dari Pks13. Sementara ACCase menghubungkan rantai acyl-CoA (C₄₂-C₆₂) ke ACP terminal-C dari Pks13. Produk reaksi kondensasi ini kemudian ditransfer ke trealosa, menghasilkan α -alkil β -ketoasil

trealosa monomikolat (TMMk) yang kemudian mengalami reduksi pada gugus keto oleh CmrA, menghasilkan *trehalosa monomycolat* (TMM) (Boutte, 2019).

TMM diangkut melintasi membran dalam oleh MmpL3. Dalam periplasma TMM bergabung dengan arabinogalaktan membentuk mAG (*mycolylarabinogalactan*), proses ini melepaskan *trehalosa* yang kembali digunakan untuk membentuk TMM (Boutte, 2019).

B. Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB)

Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) didefinisikan sebagai TB yang resistan terhadap setidaknya terhadap isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF). Sementara *Extensively Drug-Resistant* (XDR-TB) didefinisikan sebagai resistansi terhadap INH dan RIF serta setidaknya satu golongan fluoroquinolon dan satu obat injeksi lini kedua (Bastos *et al.*, 2017).

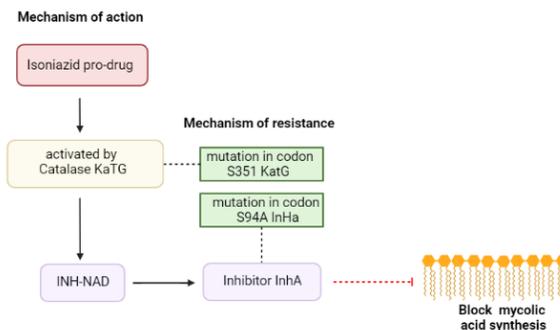
1. Resistansi ekstrinsik (*acquired drug resistance*)

Resistansi ekstrinsik merupakan resistansi yang terjadi karena adanya mutasi pada gen penyandi protein tertentu yang menjadi target obat anti-tuberkulosis. Hal ini disebabkan karena paparan obat secara terus menerus dalam jangka waktu lama dan ketidakpatuhan terhadap rejimen obat (Singh *et al.*, 2020; Ayanwale *et al.*, 2020; Iacobino *et al.*, 2020).

a. Isoniazid (INH).

INH atau asam nikotinik hidrazida disintesis pertama kali pada tahun 1912 dan digunakan sebagai obat anti-TB sejak tahun 1952. INH memiliki aktivitas bakterisidal yang selektif dan spesifik untuk spesies mikobakteri dan kompleks MTB dengan bioavailabilitas yang tinggi, penetrasi intraseluler yang sangat baik, dan spektrum aksi yang sempit (Unissa *et al.*, 2016).

INH merupakan *pro-drug* yang diaktifkan oleh enzim katalase peroksidase (KatG) yang dikodekan oleh gen Rv1908c. KatG mengaktifkan INH untuk membentuk anion atau radikal *isonicotinoyl*. Bentuk radikal ini akan bereaksi dengan NAD⁺ untuk menghasilkan INH-NAD yang berikatan dengan sisi aktif dari enzim NADH-*dependent enoyl-ACP reductase* InhA. Enzim ini berperan dalam sintesis memanjangkan asam lemak FAS II untuk membentuk asam mikolat. Kompleks INH-NAD mengikat dan menghambat InhA sehingga menyebabkan gangguan biosintesis asam mikolat dan kematian sel (Vilchèze & Jr, 2014) (Unissa *et al.*, 2016).



Gambar 6. Mekanisme aksi dan mekanisme resistansi INH

Resistensi *M. tuberculosis* terhadap INH sebagian besar disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi KatG yang mengubah ekspresi enzim KatG dan mencegah pembentukan kompleks INH-NAD. Mutasi katG yang paling sering terjadi adalah pada kodon S315, dimana setiap basa (AGC) dapat bermutasi dan menghasilkan residu Thr, Asn, Arg, Ile, Gly, atau Leu. Mutasi S315T ditemukan hingga 94% dari isolat klinis yang resisten terhadap INH. Penelitian biokimia melaporkan bahwa mutasi pada KatG (S315T) memiliki aktivitas katalase-peroksidase, tetapi kemampuannya untuk mengoksidasi INH berkurang secara signifikan (Unissa *et al.*, 2016).

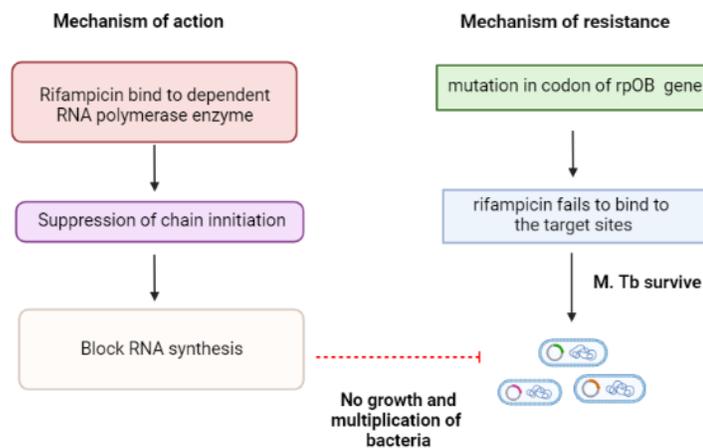
Mekanisme resistensi yang kedua adalah mutasi pada InhA atau daerah promotornya sehingga enzim ini tahan terhadap penghambatan kompleks INH-NAD. Mutasi pada kodon S94A dari InhA berkontribusi sekitar 35% resistensi *M. tuberculosis* pada INH (Unissa *et al.*, 2016).

b. Rifampisin.

Rifampisin adalah salah satu antibiotik yang paling efektif untuk infeksi oleh *M. tuberculosis*. Resistensi rifampisin jarang terjadi jika dibandingkan dengan antibiotik lain dan sekitar 90% kasus resisten rifampisin juga resisten terhadap isoniazid. Oleh karena itu, resistensi rifampisin dianggap sebagai penanda TB MDR (Eddabra, 2020).

Resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin terutama disebabkan oleh delesi maupun duplikasi pada tiga gen RNAP yaitu rpoA, rpoB dan rpoC.

RNAP adalah gen pengkode subunit- β RNA polymerase yang merupakan target pengikatan rifampisin. Beberapa penelitian telah mengidentifikasi kodon spesifik yang dapat menyebabkan resistansi rifampisin. Kodon yang paling sering bermutasi mutasi adalah 516, 526, atau 531 dari lokus *rpoB*. Potensi resistansi silang rifampisin telah dilaporkan oleh beberapa peneliti, hal ini ditandai dengan perubahan konformasi kodon pada kodon 518 atau 529 (Dubey, 2017; Brandis & Hughes, 2018; Eddabra, 2020).



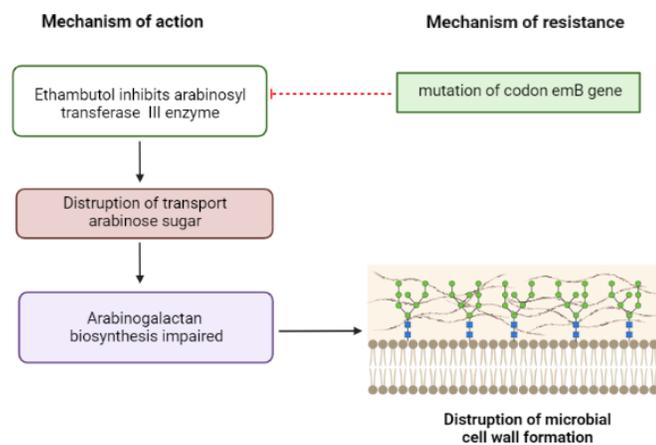
Gambar 7. Mekanisme aksi dan mekanisme resistensi rifampisin

c. Etambutol.

Etambutol diperkenalkan pada tahun 1966 untuk pengobatan tuberkulosis. Etambutol bersifat bakteriostatik dengan mempengaruhi biosintesis arabinogalaktan pada dinding sel mikobakteri. Dalam *M. tuberculosis*, *arabinosyl* transferase dikodekan oleh gen *embCAB* yang berperan dalam menggabungkan domain arabinan dari

decaprenylphosphoryl-β-D-arabinofuranose (DPA) dengan domain galaktan (Sheikh *et al.*, 2020).

Resistensi terhadap etambutol terutama disebabkan oleh mutasi pada gen *embB*. Beberapa penelitian telah membuktikan lokasi mutasi secara khusus terletak pada posisi *embB306* (Sheikh *et al.*, 2020).



Gambar 8. Mekanisme aksi dan mekanisme resistensi etambutol

2. Resistansi intrinsik (*innate drug resistance*)

Resistensi antibiotik intrinsik terjadi secara alami karena kemampuan evolusi dari *M. tuberculosis*. Mekanisme evolusi yang telah diteliti antara lain pembentukan selubung sel, *efflux pump*, dan mekanisme lainnya yang memungkinkan bakteri memiliki tingkat resistansi obat yang tinggi. Mekanisme ini dapat dijadikan target dalam desain pengembangan obat baru (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

a. Selubung Sel.

Selubung sel mikobakteri memiliki komposisi dan struktur lipid yang tidak biasa yang berkontribusi terhadap virulensi dan resistansi obat intrinsik. Model terbaru untuk selubung sel mikobakteri terdiri atas tiga bagian yaitu lapisan terluar yang disebut kapsul, dinding sel, dan membran sel. Kapsul luar terutama terbentuk dari protein, glukosa, dan sedikit lipid. Dinding sel terdiri dari mikomembran luar, arabinogalaktan, dan peptidoglikan dalam (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

Diasumsikan bahwa lapisan hidrofilik terdalam dari peptidoglikan dan arabinogalaktan menghambat penetrasi molekul hidrofobik. Sebaliknya di bagian luar amplop, lapisan peptidoglikan dan arabinogalaktan terkait dengan lapisan asam mikolat hidrofobik, dibentuk oleh asam lemak rantai panjang yang membatasi penetrasi obat hidrofilik. Ruang periplasma yang memisahkan dinding sel dari membran lipid bilayer melindungi sel dari tekanan lingkungan dan bertindak sebagai penghalang permeabilitas. Adanya keberagaman lipid pada selubung sel yang sangat tebal dan hidrofobik menghambat difusi bahkan untuk molekul hidrofobik, yang meliputi antibiotik seperti rifamisin, golongan makrolida, golongan fluoroquinolon, dan tetrasiklin (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

Obat TB lini pertama yaitu agen bakterisida INH menghambat sintesis asam mikolat, sedangkan EMB yang bersifat bakteriostatik menghambat

sintesis arabinogalaktan dan dapat mensensitisasi *M. tuberculosis* terhadap obat lain. Cacat jenis apa pun pada enzim dan protein yang berkontribusi terhadap pembentukan integritas selubung dinding sel dapat mengakibatkan peningkatan kerentanan mikobakterium terhadap beberapa obat (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

b. Pompa efluks (EP).

Pompa efluks adalah protein transmembran yang memberikan resistansi dengan mengeluarkan obat dari bagian dalam ke bagian luar sel. Pompa efluks bertanggung jawab atas resistansi intrinsik dalam mikobakteri terhadap banyak obat anti-TB seperti golongan fluoroquinolon, tetrasiklin, dan golongan aminoglikosida. Protein-protein ini adalah protein membran *spanning* yang berperan penting dalam metabolisme bakteri, fisiologi, transportasi nutrisi, racun, limbah, atau molekul sinyal melalui selubung sel dan penghabisan antibiotik dari bakteri untuk memberikan MDR (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Kapp *et al.*, 2017).

Strategi yang digunakan untuk menghambat resistansi obat yang dimediasi efluks adalah penghambatan efluks oleh molekul non-antibiotik yang memblokir EP atau menghambat sumber energi EP. Inhibitor yang paling banyak dipelajari adalah verapamil (VP), thioridazine (TZ), reserpin, dan piperin yang digunakan dalam kombinasi dengan obat anti-TB untuk mengurangi atau meniadakan resistansi obat yang disebabkan oleh aktivitas

EP. Inhibitor EP saat ini tidak digunakan untuk pengobatan TB manusia, dengan pengecualian TZ, yang diberikan dalam beberapa beberapa kasus TB-XDR (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

c. Mekanisme lain.

Mekanisme yang paling penting dari resistansi obat intrinsik *M. tuberculosis* adalah selubung sel yang kaya lipid dan EP, tetapi sistem lain diketahui dapat menetralkan bahan kimia beracun dan antibiotik, termasuk inaktivasi atau modifikasi obat, dan modifikasi target (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

Beberapa enzim yang dihasilkan oleh selubung sel telah berevolusi sehingga bisa menurunkan efek dari berbagai kelas antibiotik yang berbeda seperti golongan aminoglikosida, β -laktam dan makrolida. Antibiotik menjadi tidak aktif oleh modifikasi kimia seperti metilasi dan asetilasi, yang selanjutnya mencegah pengikatan antibiotik ke protein target dan menyebabkan resistansi antibiotik. Enzim mikobakteri yang berevolusi dapat memodifikasi antibiotik dengan menambahkan gugus kimia pada tempat spesifik antibiotik (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

C. Senyawa Piperin

Lada hitam (*Piper nigrum* L.) adalah salah satu rempah-rempah yang paling populer dan telah lama digunakan di seluruh dunia. Lada hitam dikenal sebagai "raja rempah-rempah" dan dijuluki sebagai *Black Gold* sebab menempati status perdagangan yang unggul di antara rempah-rempah yang lain (Gorgani *et al.*, 2017; Ashokkumar *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2019).

Sejak jaman dahulu, masyarakat menggunakan lada hitam sebagai obat tradisional dan pengawet makanan karena memiliki aktivitas anti-bakteri dan anti-jamur. Kandungan senyawa bioaktif di dalam lada hitam antara lain piperin, minyak atsiri, dan minyak esensial (Tiwari *et al.*, 2020; Amperayani *et al.*, 2018).

Piperin adalah senyawa alkaloid alami yang merupakan konstituen terbesar dalam tanaman *Piperaceae* dan berperan dalam memberikan rasa serta aroma pedas (Gorgani *et al.*, 2017; Ashokkumar *et al.*, 2021; Stojanović-Radić *et al.*, 2019). Kandungan piperin tertinggi terdapat pada lada hitam dengan kadar yang bervariasi setiap jenis, tergantung pada lingkungan termasuk iklim, kondisi tumbuh, dan tempat asalnya (Gorgani *et al.*, 2017; Stojanović-Radić *et al.*, 2019).

Piperin menunjukkan berbagai efek terapiutik yang berbeda dari komponen kimia lainnya yaitu anti-hipertensi, anti-platelet, anti-oksidan, anti-

tumor, anti-asma, anti-piretik, analgesik, anti-inflamasi, anti-diare, anti-spasmodik, ansiolitik, anti-depresan, hepato-protektif, imuno-modulator, anti-bakteri, anti-jamur, anti-tiroid, anti-apoptosis, anti-metastasis, anti-mutagenik, anti-spermatogenik, aktivitas insektisida, larvasida, dan lain-lain (Ashokkumar *et al.*, 2021; Stojanović-Radić *et al.*, 2019). Selain itu, piperin mampu merangsang enzim pankreas dan usus yang membantu pencernaan (Ashokkumar *et al.*, 2021; Damanhour, 2014).

Piperin dilaporkan pula dapat meningkatkan efektivitas terapeutik banyak obat, vaksin, dan nutrisi dengan meningkatkan bioavailabilitas oral melalui penghambatan berbagai enzim metabolisme, termasuk di antaranya obat yang digunakan dalam pengobatan tuberkulosis (Ashokkumar *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2020; Damanhour, 2014). Beberapa bukti juga mendukung aktivitas farmakologis piperin yang memodulasi transporter dan meningkatkan aktivitas enzim abolik (Tiwari *et al.*, 2020).

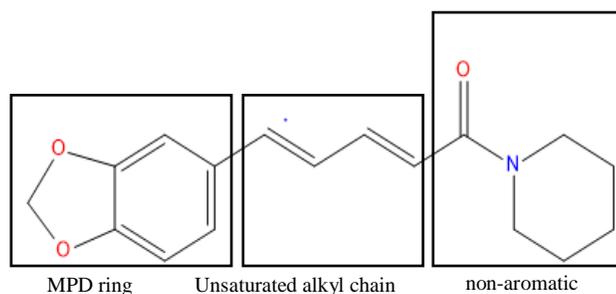
D. Potensi Senyawa Piperin Sebagai Anti-TB MDR

Piperin pertama kali diisolasi pada tahun 1819 oleh Hans Christian Orsted. Ia mengekstraksi bahan kristal kuning yang memiliki rumus molekul $C_{17}H_{19}NO_3$ dengan titik leleh 128-130° C. Kemudian, struktur kimianya dijelaskan dengan nama IUPAC 1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4pentadienyl]piperidine.

Piperin bersifat basa lemah, yang pada hidrolisis (asam/basa) dapat diubah menjadi asam piperat dan piperidin (Tiwari *et al.*, 2020).

Piperin dapat menjadi senyawa yang mengarah pada penemuan anti-bakteri baru dengan efek samping yang minimal. Dengan struktur kimia yang berbeda dari obat anti-TB, piperin dianggap sebagai senyawa perancah yang dapat dikembangkan sebagai senyawa bioaktif baru dengan tingkat resistansi dan toksisitas yang lebih rendah (Hu *et al.*, 2019; Mgbeahuruike *et al.*, 2019; Sieniawska *et al.*, 2020).

Struktur piperin terutama terdiri dari tiga situs akseptor hidrogen, tiga situs hidrofobik, dan cincin aromatik. Rantai alifatik terkonjugasi bertindak sebagai struktur penghubung antara piperidin dan bagian 5-(3,4-metilendioksifenil). Hal ini membuat piperin menjadi molekul yang unik dan berpotensi optimal memberi kecenderungan pada molekul untuk mengikat enzim CYP-450 (Tiwari *et al.*, 2020; de Alencar Filho & Silva, 2017).



Gambar 9. Struktur piperin (de Alencar Filho & Silva, 2017)

Studi HKSA (Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas) menunjukkan keberadaan atom karbon kuartener sebagai persyaratan struktural utama untuk aktivitas anti-TB. Studi ini juga mendukung peran bagian lipofilik terpen untuk aktivitas anti-mikobakteri (Tiwari *et al.*, 2020; Shityakov *et al.*, 2019).

Skor doking piperin dilaporkan lebih rendah dari dan skor doking *thiolactomycin*. Oleh karena itu, konformasi piperin lebih stabil. Piperin menunjukkan energi ikat terendah dengan skor ikat -7,15 sedangkan kuinolon menunjukkan skor energi ikat tertinggi -4,8. Dengan demikian, piperin adalah kandidat obat baru yang lebih potensial dibanding kuinolon, kumarin, dan *thiolactomycin* (de Alencar Filho & Silva, 2017).

Prediksi struktur tiga dimensi dari protein pompa efluks pada MDR Rv1258c dengan 246 ligan menggunakan prediksi doking menunjukkan bahwa residu Ser26, Ser45, Glu243, dan Trp32 sebagai situs interaksi penting yang bertanggung jawab atas afinitas (Palacio *et al.*, 1967).

Secara *in vitro*, piperin menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* yang resistan terhadap INH (KHM 7 g/mL), di mana ekstrak etanol dari lada hitam hingga 120 g/mL tidak menunjukkan efektivitas yang serupa. Penghambatan InhA dari *Mycobacterium* diperkirakan menjadi jalur mekanisme farmakologis senyawa piperin sebagai anti-tuberkulosis (Hamka., 2018.)

Beberapa penelitian terbaru menunjukkan aktivitas piperin pada *strain* MDR TB melalui beberapa mekanisme. Piperin dapat bertindak sebagai

penghambat *efflux pump* (EPI) yang merupakan target baru untuk bakteri TB resisten (Hu *et al.*, 2019; Sieniawska *et al.*, 2020; Hegeto *et al.*, 2019; Sarangi *et al.*, 2021; Brown *et al.*, 2021). Piperin juga dianggap sebagai senyawa yang meningkatkan pembunuhan *strain* MDR *M. tuberculosis* melalui penghambatan P-glikoprotein patogen, yang ekspresinya terkait dengan peningkatan toleransi basil terhadap obat anti-TB (Hu *et al.*, 2019).

Sebuah studi menunjukkan mutasi pada titik V219A dan S292L pada gen Rv1258c terbukti menyebabkan resistansi obat yang signifikan terhadap pirazinamid (PZA), isoniazid (INH), dan streptomisin (SM), tetapi tidak terhadap obat lain. Mutasi titik V219A menghasilkan resistansi tingkat rendah terhadap obat, sedangkan mutasi S292L menunjukkan tingkat resistansi yang lebih tinggi. Piperin dapat menghambat resistansi isoniazid pada mutan S292L, tetapi tidak pada mutan V219A (Biswas *et al.*, 2021).

Studi kombinasi piperin/INH atau piperin/PZA menunjukkan bahwa piperin mengurangi resistansi INH dan PZA atau meningkatkan kerentanan INH dan PZA pada galur *M. tuberculosis* mutan Rv1258c S292L, tetapi jauh lebih sedikit pada galur mutan V219A yang mungkin disebabkan oleh aktivitas penghambat *efflux pump* yang rendah pada mutan V219A dibandingkan dengan mutan S292L (Liu *et al.*, 2019).

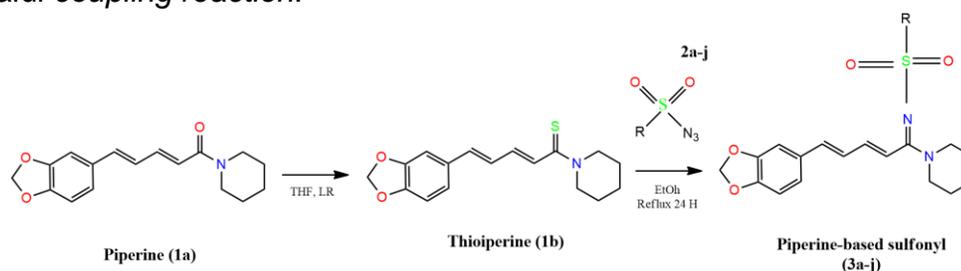
Pengujian reserpin dan piperin sebagai inhibitor pompa efluks menggunakan REMA menunjukkan efek yang sama dibandingkan dengan

verapamil terhadap *M. tuberculosis*. Namun, penggunaan piperin terbatas sampai pada konsentrasi hingga 25 g/ml karena memiliki efek sitoksisitas (Jang *et al.*, 2017).

Sintesis dan evaluasi senyawa analog piperin terhadap *strain M. tuberculosis* H37Rv telah banyak dilakukan. Hasil sintesis menunjukkan aktivitas anti-tuberkular yang lebih baik dibanding etambutol dan atau dengan isoniazid (Hu *et al.*, 2019; Shityakov *et al.*, 2019).

E. Sintesis senyawa Turunan Piperin

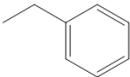
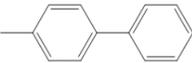
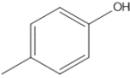
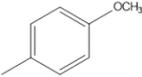
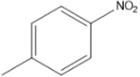
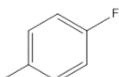
Desain terhadap turunan senyawa piperin dengan penambahan gugus *sulfonyl-amidine* telah dilakukan oleh (Aswad *et al.*, 2017) dalam 2 tahapan. Langkah pertama adalah dengan mereaksikan senyawa piperin dengan pereaksi Lawesson menggunakan pelarut THF untuk membentuk senyawa tiopiperin. Kemudian langkah selanjutnya adalah mereaksikan senyawa tiopiperin yang terbentuk dengan beberapa jenis senyawa sulfonyl azida melalui *coupling reaction*.

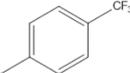
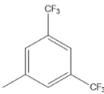


Gambar 10. Skema sintesis senyawa *piperine-based sullfonyl amidine* (Aswad *et al.*, 2017)

Mekanisme *coupling reaction* diawali dengan resonansi elektron pada tiomida yang menyebabkan transfer elektron dari atom sulfur ke atom nitrogen. Sulfonil azida yang kekurangan elektron kemudian beraksi dengan tioamida membentuk ikatan nitrogen-sulfur, diikuti dengan pembentukan ikatan karbon-nitrogen menghasilkan *thiatriazoline*. Reaksi retro-sikloadisi selanjutnya memutus ikatan pada cincin *thiatriazoline* dan menghasilkan senyawa *sulfonyl-amidine*, gas nitrogen, dan sulfur padat (Aswad *et al.*, 2013).

Tabel 1. Hasil sintesis senyawa *piperine-based sulfonyl-amidine* (Aswad *et al.*, 2017)

No.	R	2	3	Yield (%)
1.		2a	3a	84
2.		2b	3b	50
3.		2c	3c	42
4.		2d	3d	33
5.		2e	3e	43
6.		2f	3f	95
7.		2g	3g	80

8.		2h	3h	88
9.		2i	3i	97
10.	-CH3	2j	3j	47

F. Media Kultur *Mycobacterium tuberculosis*

Media untuk biakan mikobakteri dibagi ke dalam tiga kelompok utama yaitu media berbasis telur, media berbasis agar, dan media cair. Media ideal untuk isolasi tuberkel basili harus ekonomis dan mudah dibuat, mampu menghambat pertumbuhan kontaminan, mendorong pertumbuhan mikobakteri agar dapat tumbuh subur, dan memungkinkan melakukan deferensiasi isolat secara dini berdasarkan morfologi koloni (Daulay *et al.*, 2015). Medium untuk perbenihan *Mycobacterium* yang sering digunakan antara lain adalah Lowenstein Jensen, Ogawa, Middle brook, dan Bactec. (Hartini *et al.*, 2018)

1. Lowenstein Jensen

Media Lowenstein Jensen (LJ) merupakan modifikasi International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) yang saat ini digunakan secara luas untuk kultur bakteri TB. Media LJ mengandung gliserol yang menyuburkan pertumbuhan *M. tuberculosis*. Media LJ merupakan *gold standard* yang sangat ideal bagi pertumbuhan *Mycobacterium*. Namun, media LJ masih dikategorikan mahal untuk masyarakat menengah kebawah di

Indonesia, dan juga waktu yang lama untuk mendapatkan hasil pemeriksaan. (Daulay *et al.*, 2015) (Hartini *et al.*, 2018).

2. Ogawa

Media Ogawa atau modifikasi Ogawa merupakan media kultur yang lebih murah daripada media LJ karena dibuat tanpa asparagin. Kandungan garam-garam mineral yang telah dicampur dapat disimpan lama sedangkan campuran pewarna tidak dapat disimpan lama karena mengendap atau berubah menjadi larutan yang berwarna sangat pucat. (Daulay *et al.*, 2015) (Ariami *et al.*, 2014)

3. Middlebrook

Media Middlebrook 7H10 adalah media pertumbuhan padat yang khusus digunakan untuk kultur *Mycobacterium*, terutama *M. tuberculosis*. Media ini digunakan untuk penetapan resistensi bakteri *M. tuberculosis*, sedangkan media Lowenstein Jensen digunakan untuk membiakkannya. (Hartini *et al.*, 2018) (Purwanti *et al.*, 2013)

G. Metode Deteksi Resistansi Obat Anti-Tuberkulosis

1. Metode proporsi (Konvensional)

Metode proporsi agar merupakan metode yang paling banyak digunakan di antara metode konvensional lain. Metode ini dapat menghasilkan determinasi yang tepat dari proporsi mutan yang resistan terhadap obat

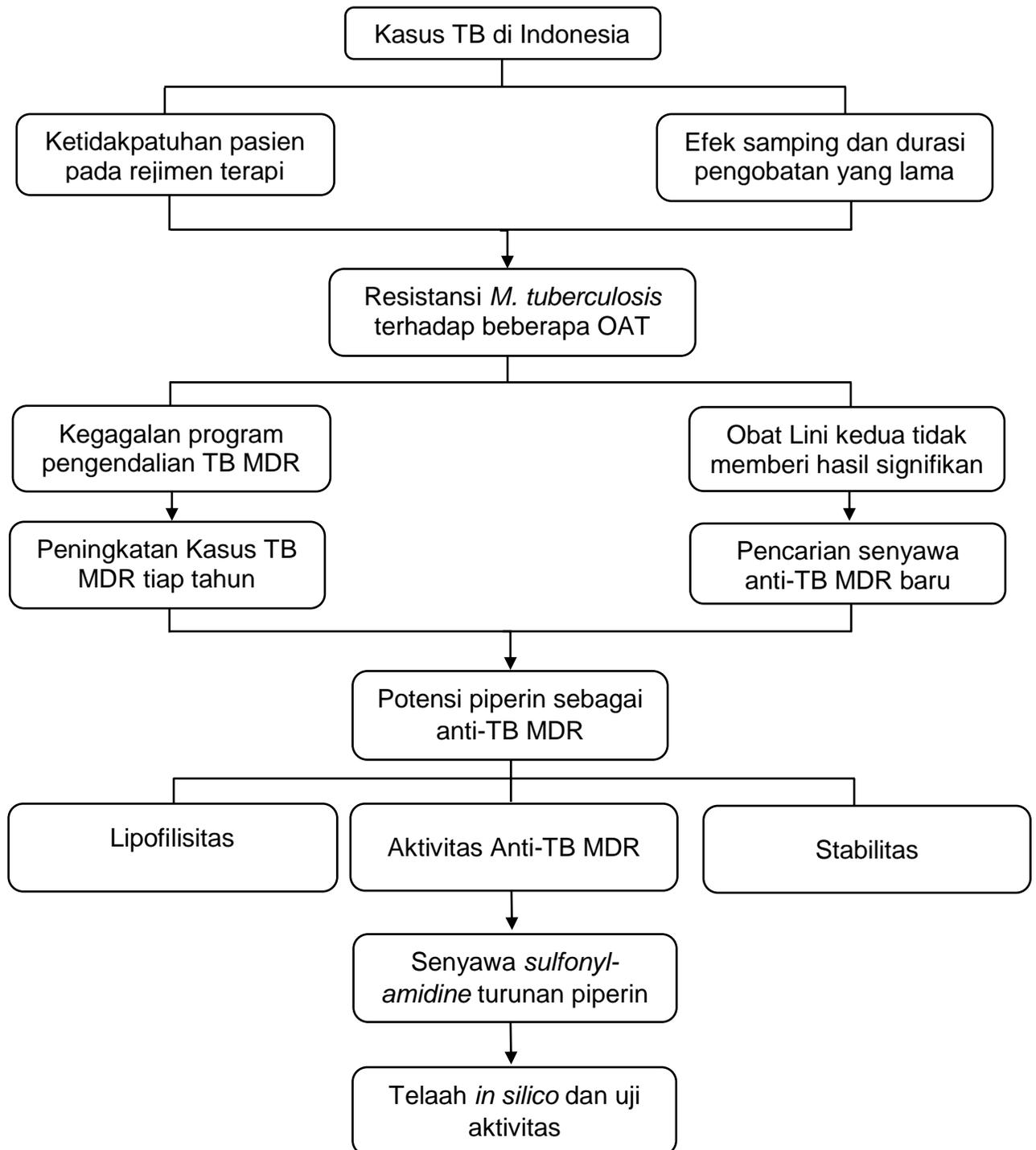
tertentu. Pada metode ini, larutan bakteri serial dengan pengenceran 100 kali diinokulasikan pada media yang mengandung obat dan media kontrol.

Jika dilakukan pada media LJ, hasil dibaca setelah inkubasi selama 28 hari pada suhu 37° C. Isolat dengan resistansi minimal 1% akan dilaporkan sebagai resistan terhadap konsentrasi obat tersebut. Jika proporsi bakteri yang resistan lebih dari 1% untuk isoniazid, rifampisin, *para-amino salysilic acid*, dan 10% untuk jenis obat lain, strain dianggap resistan dan tes dikatakan selesai. Pada hari keempat inkubasi, pembacaan kembali dilakukan untuk menilai jika strain sensitif untuk beberapa obat.

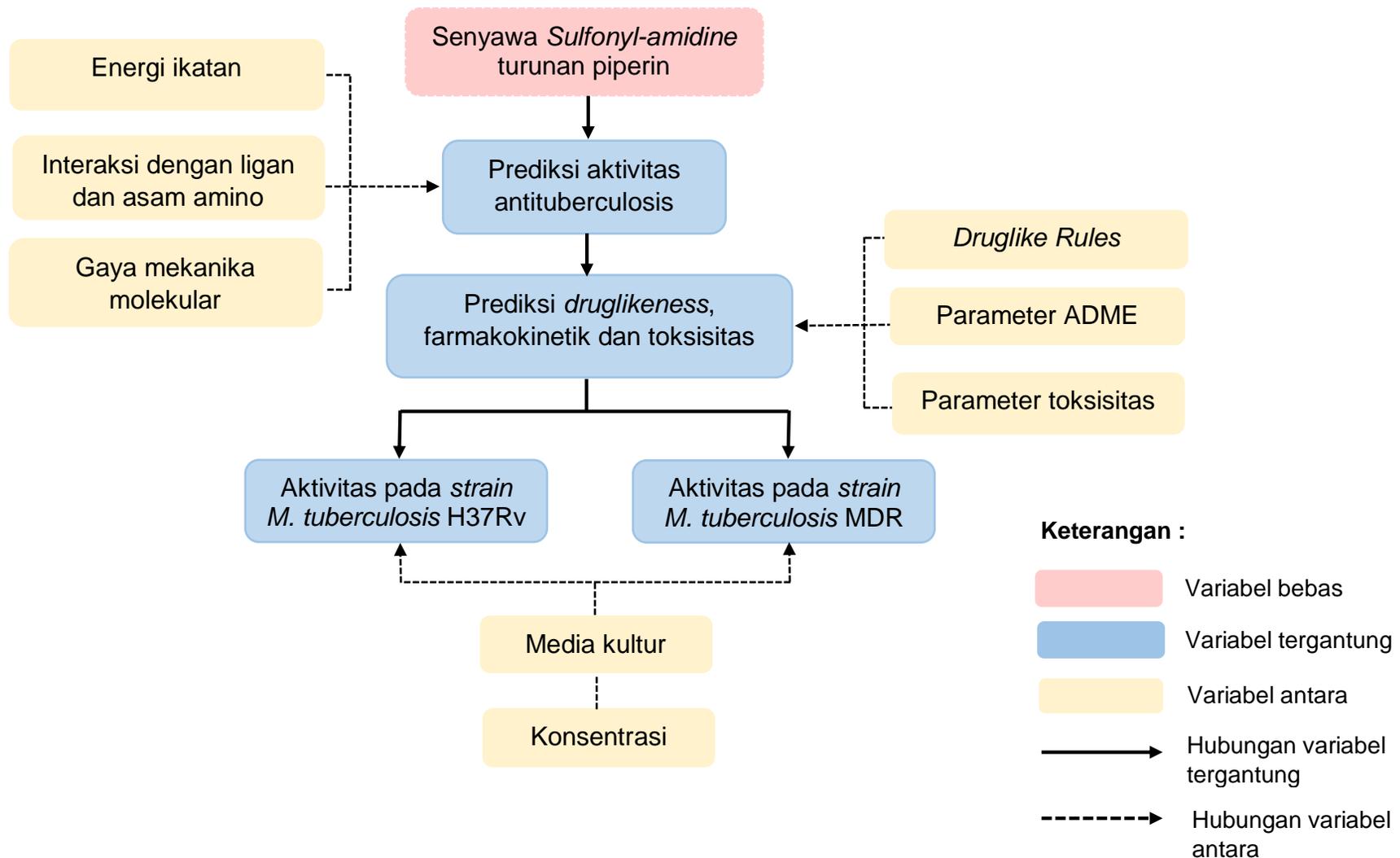
2. Metode MGIT (Modern)

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) merupakan salah satu generasi baru dari alat diagnostic TB. Sistem MGIT merupakan metode yang cepat dan tidak berbahan radioaktif, digunakan untuk mendeteksi dan uji sensitifitas dari *Mtb*. Prinsipnya berdasarkan deteksi pertumbuhan mikobakterium pada tabung yang mengandung Middlebrook 7H9 yang dimodifikasi serta sensor oksigen berbasis pemadaman fluoresensi saat diluminasi lampu UV. Medium cair MGIT menghasilkan data diagnostik yang lebih cepat dan sensitif (42 hari) dalam mendeteksi *M. tuberculosis*.

H. Kerangka Teori



I. Kerangka Konsep



J. Hipotesis

Senyawa *sulfonyl-amidine* turunan piperin yang diujikan berdasarkan prediksi *molecular docking* dan *molecular dynamic* dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* strain MDR.