

**PENGARUH EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) UNTUK
MENINGKATKAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISONIAZID
DAN RIFAMPISIN TERHADAP MDR-TUBERKULOSIS**

*THE INFLUENCE OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE
(EGCG) IN INCREASING THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF
ISONIAZID AND RIFAMPICIN AGAINST
MDR-TUBERCULOSIS*

NURUL HIDAYAH HAMZAH

N012211020



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**PENGARUH EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) UNTUK
MENINGKATKAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISONIAZID
DAN RIFAMPISIN TERHADAP MDR-TUBERKULOSIS**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

NURUL HIDAYAH HAMZAH

N012211020

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) UNTUK MENINGKATKAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISONIAZID DAN RIFAMPISIN TERHADAP MDR-TUBERKULOSIS

Disusun dan diajukan oleh
NURUL HIDAYAH HAMZAH
NIM N012211020

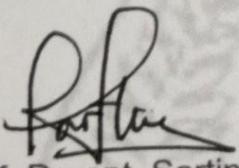
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Magister Program Studi Magister Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

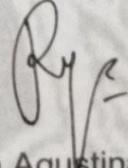
Pada tanggal
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

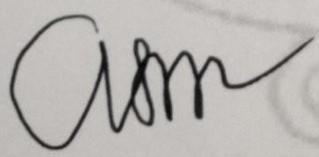
Pembimbing Pendamping

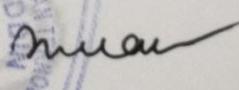

Prof. Dr. apt. Sartini., M.Si.
NIP. 19611111 198703 2 001


apt. Rina Agustina, M.Pharm. Sc., Ph. D
NIP. 19840821 201012 2 005

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin


apt. Muhammad Aswad, M.Si., Ph. D
NIP. 19800101 20031 2 1004


Prof. Dr. rer-nat. apt. Marianti A. Manggau
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nurul Hidayah Hamzah

Nomor Mahasiswa : N012211020

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S2

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, Juli 2023

Yang menyatakan



Nurul Hidayah Hamzah

PRAKATA

Alhamdulillah Rabbil'alamiin, puji syukur kepada Allah SWT. karena atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai syarat memperoleh gelar magister di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Tak lupa pula shalawat dan taslim penulis sampaikan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi pemberi cahaya dan ilmu yang bermanfaat.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun tesis ini begitu banyak kendala yang penulis alami. Namun, karena adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, akhirnya penulis mampu merampungkan tesis ini. Banyak kendala yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan tesis ini, namun dapat diselesaikan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. apt. Sartini, M. Si dan apt. Rina Agustina, M.Pharm. Sc., Ph. D selaku Komisi Penasihat yang telah banyak memberi masukan, arahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. apt. Gemini Alam, M. Si, Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph. D dan Dr. apt. Herlina Rante, M. Si selaku tim Komisi Penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.

3. Dekan, Wakil Dekan, Bapak-Ibu dosen, khususnya dosen Penasihat Akademik (PA) Prof. Dr. apt. Sartini, M. Si, 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. Orang tua penulis, Ibunda Halijah dan Ayah Hamzah untuk semua doa, serta kasih sayang tulus yang telah diberikan yang tidak akan mampu penulis balas. Kakak dan adik penulis, Muhammad Akram, Musyahidah dan Ahmad Khairul zaki untuk motivasi serta kepada sanak keluarga yang turut mendoakan.
5. Rekan-rekan magister pascasarjana angkatan 2021 yang telah banyak membantu, khususnya Desy Ayu Lestari, Tri Puspita Roska, Ardiyah Nurul Fitri Marzaman, Nana Novriana, Anwar Sam, Resky Nugraha dan Devy Lianto serta adik-adik semoga kesuksesan menyertai kita semua.
6. Semua pihak yang terlibat, yang tidak sempat tersebut namanya.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun, di dunia tak ada satupun yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk menciptakan karya yang lebih bermutu. Akhir kata, semoga karya kecil ini dapat memberi manfaat

bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang farmasi,
Aamiin.

Makassar, Juli 2023

Nurul Hidayah Hamzah

ABSTRAK

NURUL HIDAYAH HAMZAH, *Pengaruh Epigallokatekin Galat (EGCG) Untuk Meningkatkan Aktivitas Antibakteri Isoniazid dan Rifampisin terhadap MDR-TB (dibimbing oleh Sartini dan Rina Agustina).*

Epigallokatekin galat (EGCG) merupakan komponen utama terbesar yang terkandung dalam katekin teh hijau (*Camelia sinensis* L). Salah satu senyawa dari bahan alam yang memiliki banyak manfaat kesehatan termasuk antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antimikroba. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek hambat dengan berbagai konsentrasi dan efek kombinasi senyawa epigallokatekin galat (EGCG) dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) pada aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* dan MDR-TB. Penelitian ini menggunakan media MGIT yang telah dimodifikasi dengan sistem BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960. BACTEC MGIT 960 merupakan salah satu metode kultur TB yang didukung dan direkomendasikan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO). Penggunaan BACTEC MGIT 960 untuk uji kepekaan obat antituberkulosis mempunyai kelebihan yaitu hasil diperoleh lebih cepat dengan akurasi yang sama bila menggunakan media padat. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa hasil pengujian senyawa epigallokatekin galat (EGCG) pada konsentrasi 150 ppm, 75 ppm dan 37,5 ppm tidak memberikan aktivitas antibakteri terhadap M. Tb strain H37Rv. Sedangkan senyawa epigallokatekin galat (EGCG) 300 ppm memberikan aktivitas antibakteri terhadap M. Tb strain H37Rv, karena tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada strain H37Rv dengan unit pertumbuhan 0. Hal ini sesuai dengan kontrol positif yang terdiri dari OAT (isoniazid dan rifampisin) juga menunjukkan tidak adanya pertumbuhan pada strain H37Rv. Hasil efek senyawa epigallokatekin galat (EGCG) dengan berbagai konsentrasi dan efek kombinasi senyawa epigallokatekin galat (EGCG) konsentrasi 300 ppm dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) pada aktivitas antibakteri isoniazid dan rifampisin terhadap MDR-TB tidak memiliki efek penghambatan, diperoleh adanya pertumbuhan sampai angka 400.

Kata Kunci: Epigallokatekin galat (EGCG), Bactec MGIT 960, Antituberkulosis, *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* dan MDR-TB.

ABSTRACT

NURUL HIDAYAH HAMZAH, *The Influence of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Increasing the Antibacterial Activity of Isoniazid and Rifampicin Against MDR-Tuberculosis (dibimbing oleh Sartini dan Rina Agustina).*

Tuberculosis (TB) remains a major global health concern, especially with the emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). The effectiveness of conventional anti-TB drugs, such as isoniazid and rifampicin, is diminishing due to the development of drug resistance. Therefore, there is a critical need to explore novel strategies to enhance the antimicrobial activity of existing drugs. This research investigates the influence of epigallocatechin gallate (EGCG), a bioactive compound found in green tea (*Camelia sinensis* L), in increasing the antibacterial activity of isoniazid and rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and MDR-TB strains. Using modified MGIT media with the BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) 960 system, this study evaluated the minimum inhibitory concentration (MIC) on *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR-TB and the effect of the combination of EGCG compounds with first-line anti-tuberculosis drugs (isoniazid and rifampicin) on antibacterial activity against MDR-TB which did not show an inhibitory effect. While the inhibitory effect of the combination of EGCG compounds with first-line anti-TB drugs (isoniazid and rifampicin) had an inhibitory effect because they showed no growth in the H37Rv strain with 0 growth units. This was consistent with the positive control consisting of a mixture of anti-tuberculosis drugs (isoniazid and rifampicin) which also showed no growth in the H37Rv strain. This research has proven that EGCG has antibacterial activity and can increase the potency of the first-line anti-TB drugs (isoniazid and rifampicin) when used together.

Keywords: Epigallocatechin gallate (EGCG), Bactec MGIT 960, Antituberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and MDR-TB.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	III
PRAKATA	V
ABSTRAK	VIII
ABSTRACT	IX
DAFTAR ISI	X
DAFTAR TABEL	XI
DAFTAR GAMBAR	XII
DAFTAR LAMPIRAN	XIII
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	XIV
BAB I _PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II _TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Tuberkulosis	6
B. Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
C. Multidrug Resistance Tuberkulosis	21
D. Epigallokatekin Galat (EGCG)	25
E. Isoniazid (INH)	26
F. Rifampisin (RIF)	29
G. Media Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
H. Metode Pengujian Aktivitas Antituberkulosis	32
BAB III _METODE PENELITIAN	37
A. Rancangan Penelitian	37
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	37
C. Alat dan Bahan	37
D. Prosedur Kerja	38
BAB IV _HASIL DAN PEMBAHASAN	43
A. Hasil Pengujian Berbagai Konsentrasi Senyawa Epigallokatekin galat (EGCG) terhadap <i>Mycobacterium Tuberculosis H₃₇Rv</i> dan <i>MDR-Tuberculosis</i>	43
B. Hasil Pengujian Efek Kombinasi Senyawa Epigallokatekin galat (EGCG) dengan OAT Lini Pertama (Isoniazid dan Rifampisin)	48
BAB V _PENUTUP	56
A. KESIMPULAN	56
B. SARAN	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

TABEL 1. HASIL UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) DENGAN BERBAGAI KONSENTRASI TERHADAP BAKTERI M. TUBERCULOSIS.	44
TABEL 2. HASIL UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) DAN OAT (ISONIAZID DAN RIFAMPISIN) TERHADAP BAKTERI STRAIN H37RV DAN MDR.	48

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1. PATOGENESIS INFEKSI M. TUBERCULOSIS	8
GAMBAR 2. SEL M. TUBERCULOSIS	18
GAMBAR 3. STUKTUR DINDING SEL M. TUBERCULOSIS (BOUTTE, 2019.)	20
GAMBAR 4. STRUKTUR SENYAWA EPIGALLOKATEKIN-GALAT (EGCG) (MUSIAL, C ET AL., 2020).	25
GAMBAR 5. STRUKTUR ISONIAZID (P. HEGDE ET AL., 2021).	26
GAMBAR 6. MEKANISME AKSI DAN MEKANISME RESISTEN ISONIAZID	27
GAMBAR 7. STRUKTUR RIFAMPISIN (KUL D, 2020).	29
GAMBAR 8. MEKANISME AKSI DAN MEKANISME RESISTEN RIFAMPISIN	30
GAMBAR 9. GRAFIK PERTUMBUHAN TERHADAP BAKTERI STRAIN H37Rv	50
GAMBAR 10. GRAFIK PERTUMBUHAN TERHADAP BAKTERI MDR	53

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. SKEMA KERJA PENELITIAN (PENGUJIAN SAMPEL HINGGA PENARIKAN KESIMPULAN)	65
LAMPIRAN 2. PERHITUNGAN KONSENTRASI SAMPEL UJI	66
LAMPIRAN 3. GRAFIK PERTUMBUHAN TERHADAP BAKTERI STRAIN H37Rv	68
LAMPIRAN 4. GRAFIK PERTUMBUHAN TERHADAP BAKTERI MDR	69
LAMPIRAN 5. DOKUMENTASI PENELITIAN	70
LAMPIRAN 6. HASIL TCM	71
LAMPIRAN 7. HASIL UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EPIGALLOKATEKIN GALAT (EGCG) DAN OAT (ISONIAZID DAN RIFAMPISIN) TERHADAP BAKTERI STRAIN H37RV DAN MDR.	72

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan Keterangan
g	Gram
INH	Isoniazid
LJ	Löwenstein Jensen
mg	Miligram
mL	Mililiter
MDR	Multidrug-resistant Tuberculosis
MGIT	Mycobacterium Growth indicator Tube
RIF	Rifampisin
TCM	Tes Cepat Molekuler

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi menular melalui udara yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. World Health Organization (WHO) telah menempatkan tuberkulosis sebagai *Global Emergency*, penyebab utama kematian di seluruh dunia dengan perkiraan 1,4 juta kematian pada tahun 2019 dan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Hal ini terjadi disebabkan oleh adanya resistensi bakteri terhadap obat antituberkulosis atau biasa dikenal dengan multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) (Allue *et al.*, 2021).

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) telah menjadi masalah terbesar pada pencegahan dan pemberantasan penyakit tuberkulosis. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) merupakan *Mycobacterium tuberculosis* yang telah resisten terhadap sedikitnya dua obat antituberkulosis (OAT) yang paling efektif yaitu isoniazid dan rifampisin. Munculnya multidrug-resistant tuberculosis patogen terjadi karena pengobatan yang tidak memenuhi syarat antara lain lambatnya diagnosis resistensi obat, penyediaan obat yang tidak teratur, fasilitas perawatan kesehatan yang buruk, penyalahgunaan agen antimikroba serta kepatuhan yang kurang, baik dari pihak pasien maupun klinisi (Parvez MAK *et al.*, 2019).

Adanya multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) ini telah mendorong para peneliti untuk melakukan riset atau pencarian senyawa baru baik dari bahan alam maupun senyawa sintetis. Saat ini banyak penelitian yang memanfaatkan senyawa bahan aktif dari tanaman terutama polifenol sebagai modulator untuk meningkatkan aktivitas antibiotika. Salah satunya tanaman obat yang memiliki banyak kandungan polifenol yaitu katekin teh hijau (*Camelia sinensis* L) (Parvez MAK et al., 2019).

Katekin teh hijau (*Camelia sinensis* L) telah memegang peranan penting sejak lama dalam pengobatan tradisional. Katekin yang paling melimpah dalam teh hijau telah dikaitkan dengan banyak manfaat kesehatan termasuk antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antimikroba. Komponen senyawa katekin dalam teh hijau terdiri dari epikatekin (EC) \pm 6%, epigallokatekin (EGC) \pm 20%, epikatekin-3-gallat (ECG) \pm 14%, dan epigallokatekin-3-gallat (EGCG) \pm 60% (Reygaert, 2018).

Epigallokatekin galat (EGCG) merupakan komponen utama terbesar yang terkandung dalam katekin teh hijau (*Camelia sinensis* L). Penelitian aktivitas antimikroba epigallokatekin galat (EGCG) yang dikombinasi dengan antibiotik (eritromisin dan tetrasiklin) terbukti pada pembentukan biofilm bakteri patogen dalam meningkatkan kerentanan bakteri yang diproduksi oleh lima patogen potensial bakteri yaitu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, dan *Mycobacterium smegmatis* (model spesies mikobakteri *M. tuberculosis*). LD₅₀ eritromisin untuk bakteri (*E. coli*, *M. smegmatis*, dan *P. aeruginosa*) adalah 15 µg/mL. LD₅₀ epigallokatekin galat (EGCG) adalah 50 µg/mL untuk *E. coli* dan *P. aeruginosa* dan untuk *M. Smegmatis* adalah 100 µg/mL. Adapun LD₅₀ untuk tetrasiklin adalah 15 µg/mL dan LD₅₀ epigallokatekin galat (EGCG) adalah 50 µg/mL untuk bakteri (*S. aureus* dan *S. epidermidis*). Eksperimen ini mengkonfirmasi bahwa epigallokatekin galat (EGCG) dalam kombinasi dengan antibiotik mampu secara maksimal mengurangi pembentukan biofilm pada berbagai bakteri patogen dan juga secara efektif menghambat pembentukan biofilm sekitar 95-99% untuk setiap bakteri yang telah dikonfirmasi dengan pengujian *Colony Forming Unit* (CFU), *Crystal Violet* (CV) dan resazurin (Shinde, S *et al.*, 2021).

Hasil penelitian secara *in vitro* yang dilakukan oleh Mirzautika dkk (2020) juga menunjukkan bahwa epigallokatekin galat (EGCG) memiliki aktivitas antituberkulosis pada konsentrasi 150 bpj dimana konsentrasi ini mencapai penghambatan 90% terhadap bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil juga menunjukkan potensi obat antituberkulosis (OAT) dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yakni isoniazid dengan konsentrasi 0,25 bpj dan rifampisin 0,5 bpj. Efektivitas isoniazid dan rifampisin meningkat setelah dikombinasikan dengan epigallokatekin galat (EGCG) dengan menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* mencapai 90%. Penelitian ini telah

membuktikan bahwa epigallocatekin galat (EGCG) memiliki aktivitas antituberkulosis dan dapat meningkatkan potensi OAT lini pertama jika dikombinasikan bersama (Mirzautika *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui adanya pengaruh epigallocatekin galat (EGCG) aktivitas antibakteri dengan berbagai konsentrasi dan efek kombinasi dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) dalam meningkatkan aktivitas antibakteri isoniazid dan rifampisin terhadap bakteri uji *Mycobacterium tuberculosis*.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana efek senyawa epigallocatekin galat (EGCG) dengan berbagai macam konsentrasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* dan MDR-TB?
2. Bagaimana efek kombinasi epigallocatekin galat (EGCG) dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) pada aktivitas antibakteri isoniazid dan rifampisin terhadap *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* dan MDR-TB?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek senyawa epigallocatekin galat (EGCG) dengan berbagai macam konsentrasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* dan MDR-TB.
2. Mengetahui efek kombinasi epigallocatekin galat (EGCG) dengan dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) pada aktivitas

antibakteri isoniazid dan rifampisin terhadap *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* dan MDR-TB.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan ilmu pengetahuan tentang pengaruh epigallokatekin galat (EGCG) dalam aktivitas antibakteri dengan berbagai konsentrasi dan efek kombinasi dengan OAT lini pertama (isoniazid dan rifampisin) terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tuberkulosis

1. Etiologi Tuberkulosis

Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis ditularkan dari orang yang terinfeksi ke orang lain saat menghirup droplet yang dikeluarkan mengandung bakteri TB selama berbicara, batuk atau bersin. *Mycobacterium tuberculosis* lalu melintasi mulut atau saluran hidung, saluran pernapasan bagian atas dan bronkus untuk mencapai alveoli paru-paru. Meskipun tuberkulosis merupakan infeksi paru-paru, tuberkulosis juga dapat menyebar ke organ dan jaringan lain. Setelah *M. tuberculosis* berkoloni pada inang, infiltrat seluler inflamasi ke situs ini dapat memicu paling menonjol di paru-paru. Gejala umum penderita adalah batuk, demam, hemoptisis, nyeri dada, kelelahan, dan penurunan berat badan. Masa inkubasi ditandai 4 hingga 10 minggu (Bussi, C *et al.*, 2019).

Ukuran droplet infeksi dari pasien yang terinfeksi *M. tuberculosis* berkisar antara 0,65 μ .m (kecil) hingga >7.0 μ .m (sedang– besar). *Mycobacterium tuberculosis* termasuk bakteri aerob yang sering menginfeksi jaringan yang memiliki kandungan oksigen tinggi. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri tahan asam, serta dapat diidentifikasi dengan pewarnaan asam yang secara mikroskopi disebut

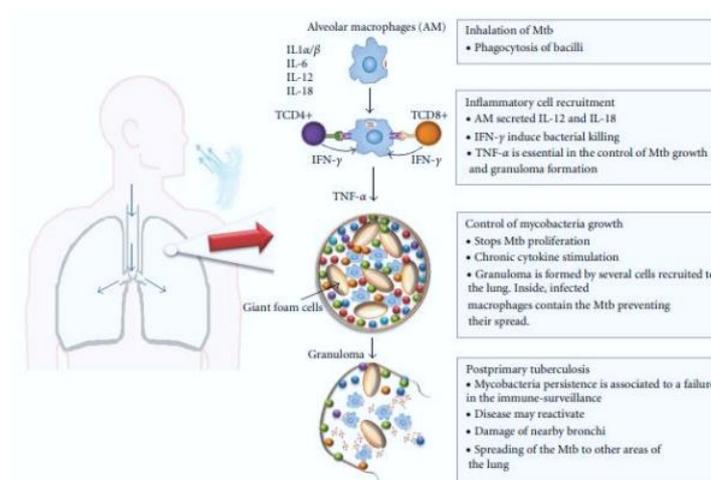
Basil Tahan Asam (BTA). Dinding sel *M. Tuberculosis* kaya lipid dan lapisan tebal peptidoglikan yang mengandung asam mikolik yang menyebabkan pertumbuhan *mycobacterium tuberculosis* menjadi lambat (Fennelly and Jones-Lopez., 2015).

Periode paling kritis untuk pengembangannya adalah 6 sampai 12 bulan pertama setelah infeksi. Sekitar 5% dari mereka yang awalnya terinfeksi dapat mengembangkan TB paru atau keterlibatan di luar paru. Infeksi sekitar 95% dari mereka yang awalnya terinfeksi menjadi laten akan tetapi dapat terinfeksi kembali di kemudian hari pada orang dewasa atau lebih tua (lansia), orang yang mengalami kekurangan berat badan dan kurang gizi dan mereka yang menderita diabetes, silikosis, atau gastrektomi (Bussi, C *et al.*, 2019).

2. Patogenesis Tuberkulosis

Tahapan patofisiologi tuberkulosis aktif adalah aerolisasi, fagositosis makrofag, bloking fagolisosom dan replikasi bakteri, respon TH1, pembentukan granuloma, manifestasi klinis dan transmisi. Aerolisasi menjadi awal sekaligus akhir dari siklus patofisiologi tuberkulosis. Bakteri yang sudah terhirup akan bertahan di lobus alveolus. Sistem imun tubuh akan merespon dengan reaksi inflamasi. Reaksi sel fagosit dan limfosit akan menimbulkan penumpukan eksudat di dalam jaringan alveoli sehingga dapat terjadi *bronchopneumonia*. Infeksi awal ini pada umumnya timbul dalam waktu dua sampai sepuluh minggu setelah paparan bakteri. Granuloma *M. tuberculosis* dapat bertahan selama bertahun-tahun pada

individu yang sehat dengan laten tuberkulosis (LTBI). Granuloma akan menjadi nekrosis sehingga patogen tidak dapat dikontrol dan berproliferasi secara masif pada inti lesi. Pecahnya lesi akan berakibat patogen memasuki aliran darah dan bisa menginfeksi organ lainnya. Keadaan laten TB berubah menjadi TB aktif dan pasien menjadi infeksi (Brooks GF., 2013).



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

a. 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 mannose (MR) menghambat respiratory burst dan mencegah pematangan fagosom. Sementara ligasi sel pembunuh alami (NK) melalui reseptor NKp46 akan melisiskan makrofag yang terinfeksi dan menginduksi sitokin pro-inflamasi (Zuiga *et al.*, 2012; Sakamoto, 2012; Ravimohan *et al.*, 2018; Luies & Preez, 2020).

b. Produksi sitokin pro-inflamasi

Basil yang dapat bertahan hidup dan berkembang dalam makrofag alveolar dan sel dendritik akan menginduksi mediator imun seperti TNF- α , IL6, 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).

c. 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).

d. 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).

3. Peranan Sistem Imun Melawan Infeksi Tuberkulosis

Sistem kekebalan tubuh host dibedakan menjadi dua yaitu alami (innate) dan respon imun didapat (adaptive). Berbagai sel imun memiliki fungsi tertentu yang bekerjasama dalam melawan infeksi *M. tuberculosis* (Abbas A, *et al.*, 2019).

a. Mekanisme Sistem Imun Alami dalam Melawan Infeksi Tuberkulosis

Sistem imun alami adalah komponen filogenik tertua pada sistem imunitas manusia. Sistem imun alami sangat kompleks dan terdiri dari sel pertahanan terhadap infeksi (epitel pada kulit, gastrointerstinal, pernapasan, dan genitalia), protein antimikroba, komponen humoral (komplemen dan opsinin) serta komponen seluler (neutrophil, makrofag, sel dendrit, dan limfoid sel) (Abbas A, *et al.*, 2019). Setelah masuk ke kantong alveolus, basil akan menghadapi makrofag alveolus atau disebut dust cell beserta monosit dan sel dendrit. Bakteri berikatan dengan sel dust melalui reseptor mannose, reseptor scavenger, reseptor komplemen (CR1, CR3, CR4), Reseptor Fc dan surfactant protein receptor (SPR) (Rajaram MVS, *et al.*, 2017). Reseptor paling banyak pada makrofag adalah reseptor mannose, yang berkaitan dengan pengaturan antimikroba, antigen presentation, differensiasi makrofag, dan inflamasi (Cummings RD., 2022).

Permukaan sel *mycobacterium* yaitu glikolipid *lipoarabinomannan* (LAM) dan prekursor lipomannans (LMs) dikenali oleh *Pattern-recognition*

receptors (PRRs) alamiah. Patogen akan membangkitkan respon imun alami termasuk reseptor permukaan dan reseptor intraseluler seperti Toll Like Receptors (TLRs) (Natarajan K, *et al.*, 2011). *Mycobacterium tuberculosis* masuk ke dalam makrofag melalui lectin tipe-C, CD91, dan membran TLRs (Ferluga J, *et al.*, 2020).

Toll Like Receptors (TLRs) mengeluarkan sinyal yang menstimulasi ekspresi sitokin dan protein lain pada respon inflamasi dengan mengaktifkan fagosit dan sel lainnya (Abbas A, *et al.*, 2019). TLR-2 bertanggung jawab pada pengenalan *Mycobacterium tuberculosis* karena mengenal dan mengikat ligand *lipoarabinomannan* (LAM) yang dapat memberi sinyal terjadinya apoptosis pada sel hospes. *Airway Epithelial cells* (AECs), makrofag alveolus, polimorfologi dan monosit derived makrofag (MDM) mengekspresikan cathelicidin LL-37 melalui aktivasi TLR2, TLR4, dan TLR-5 pada fase awal infeksi (Mertaniasih NM, *et al.*, 2013).

Komponen dari sistem kekebalan alami adalah sel epitel, sel sentinel pada jaringan (makrofag, sel dendrit, mast sel dan lain-lain), sel-sel fagosit yang direkrut dan bersirkulasi (monosit dan neutrophil), sel limfoid alami, *natural killer* sel (NK), serta berbagai jenis protein plasma (Abbas A, *et al.*, 2019). Makrofag dan neutrophil merupakan sel pertahanan lini pertama pada infeksi ini dengan mengekspresikan peptide antimikroba yang berfungsi pada sistem kekebalan alami (Garra AO, *et al.*, 2013). Alveolar makrofag (AMs) merupakan karier primer infeksi dan

membantu munculnya respon imun pada 10 hari pertama pasca paparan, termasuk membawa bakteri dari alveolus ke interstitium paru-paru (Corleis B, *et al.*, 2020).

Neutrofil/polymononuclear leukosit (PMNs) merespon infeksi bakteri serta dominan pada inflamasi akut (Abbas A, *et al.*, 2019). Sel ini mampu membunuh bakteri patogen secara efektif karena adanya simpanan enzim proteolitik dan banyak memproduksi *reactive oxygen species* (ROS). Selain itu, neutrophil mampu mengeluarkan struktur seperti jaring yang disebut *neutrophil cellular traps* (NETs) untuk menangkap dan membunuh mikroorganisme ekstraseluler (Shao SL, *et al.*, 2020).

Setelah bakteri di fagositosis, bakteri akan mengaktifkan *Toll Like Receptors* (TLR) dan mengeluarkan *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglikan* (MAGP), DNA dan RNA ke dalam sitosol. TLRs akan mengaktifkan jalur *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) dan menstimulasi *nuclear factor kappa light chain enhancer* sel B teraktifasi (NF- κ B) dan sitokin. MAGP akan terdeteksi oleh nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)/domain perekrut caspase 15 (CARD15) dan sebaliknya akan menstimulasi NF- κ B serta sitokin seperti Tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) serta Interferon tipe 1 (IFN) (3). TNF dan IL-1 adalah mediator utama dalam penyakit inflamasi dan ikut berperan dalam netralisasi antibodi. TNF α mengaktifkan fagositosis pada makrofag, mempercepat pematangan sel dendrit, serta bertanggung jawab pada pembentukan

granuloma (Garra AO, *et al.*, 2013). Pentingnya TNF dalam melawan infeksi TB dibuktikan dengan aktifnya kembali TB pada pasien yang diresepkan obat-obatan monoclonal antibodi melawan TNF (Harris J and Keane J., 2010).

Makrofag akan mengaktifkan IL12 yang menstimulasi produksi IFN γ oleh sel *natural killer* (NK sel) (Rosyidah F, *et al.*, 2020). Sel natural killer (NK sel) yang terekrut pada lesi akan mensekresikan interferon gamma (IFN γ). Kemudian IFN γ akan mengaktifkan pematangan fagosom, meningkatkan acidification kompartemen fagosom dan membunuh *M. tuberculosis*. Interleukin 1 (IL-1) merupakan reseptor untuk mengontrol terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Abbas A, *et al.*, 2019; Garra AO, *et al.*, 2013).

TNF berfungsi untuk mengurangi jumlah bakteri dengan berbagai mekanisme contohnya aktivasi makrofag dan aktivasi Interferon- γ . TNF berikatan dengan reseptor TNFR1 dan TNFR 2 yang merekrut protein death-domain (TRADD, FADD, caspase-8). Caspase-8 yang teraktivasi akan membelah komponen seluler untuk mengamplifikasikan sinyal apoptosis melalui aktivasi efektor caspase 3. Apoptosis diperlukan untuk efferocytosis dan pembentukan respon dari sel T (Matty MA, *et al.*, 2015).

b. Mekanisme Sistem Imun Adaptif dalam Melawan Infeksi Tuberkulosis

Sistem imun adaptif diinisiasi oleh mengenalan antigen oleh antigen reseptor sel limfosit. Komponen sistem imun adaptif terdiri dari sel T dan

sel B serta Sel dendrit (Abbas A, *et al.*, 2019). Antigen eksogen diproses oleh sel dendrit (DC) dan dikenalkan pada permukaan sel mereka melalui *major histocompatibility complexes* (MHC). Dendrit Cell merupakan antigen presenting cell (APCs) pada respon imun adaptif. DC kemudian bersirkulasi ke pembuluh limfa dan berinteraksi dengan sel T alami. Ikatan antara antigen dengan T cell receptor (TCR) menyebabkan aktivasi dan proliferasi sel T. Apabila sel B mengenali antigen yang pernah dikenalnya, sel akan berdiferensiasi menjadi plasma sel yang mensekresikan immunoglobulin (Gray KJ and Gibbs JE., 2022).

IFN- γ diekspresikan oleh reseptor $\alpha\beta$ atau $\gamma\delta$ pada sel T maupun sel natural killer. Antigen spesifik sel T $\alpha\beta$ merupakan produsen utama IFN- γ dari sel CD4+. Sel CD4+ dan sel natural killer berperan dalam menghubungkan respon imunitas alami dengan imunitas adaptif. Salah satu peranan aktivasi sel T CD4+ spesifik *M. tuberculosis* adalah apoptosis sel neutrophil dengan cara memodulasi kapasitas migrasi dendritic sel (Barber-Mayer KD, *et al.*, 2015).

IL-17 adalah salah satu sitokin inflamasi terbesar pada infeksi *M. tuberculosis* oleh Sel T CD4+ spesifik. Selain regulasi positif dalam mekanisme sel T CD4+ pada infeksi *M. tuberculosis*, salah satu hal yang penting dalam sistem homeostasis sistem imun adalah regulasi negative. Mekanisme ini diperlukan dalam mengontrol sistem imun dalam merespon self-antigen, tumor, dan patogen lain. Pengaturan negatif respon inflamasi dimaksudkan untuk mencegah immunopathology dan mencegah

kerusakan jaringan yang dimediasi oleh sistem kekebalan tubuh. Sitokin anti inflamasi yang diproduksi adalah IL-10 menekan produksi IL-1 dan IL-12 oleh sel dendrit dan sel makrofag. Selain itu, Programmed death-1 (PD-1) adalah inhibitor reseptor permukaan sel yang akan diekspresikan secara kuat pada sel CD4 dan CD8 untuk menghalangi sinyal transduksi TCR. Pasien dengan TB aktif memiliki T sel dengan ekspresi PD-1 yang tinggi dan blockade PD-1 dapat meningkatkan respon sel T pada antigen *M. tuberculosis* (Barber-Mayer KD, *et al.*, 2015).

Sel T CD8+ mempunyai peranan dengan melisis sel host yang terinfeksi, dan memproduksi IFN- γ , IL-2, TNF dan sitokin-sitokin lainnya setelah mengenali antigen *M. tuberculosis*. Pada pasien dengan TB aktif, sel CD8+ lebih banyak daripada pasien Tb laten. Sel CD8+ mempunyai efek sitolitik termediasi perforasi. Sel CD8+ mempunyai efek sitolitik yang dapat membunuh *M. tuberculosis* serta dapat mengenali antigen spesifik *M. tuberculosis* yang dipresentasikan oleh molekul MHC yaitu MHC Ia (HLA-A,-B,-C) serta HLA-E (non-MHC1a). Produksi IFN- γ oleh sel CD8+ diperlukan sebagai mediator proteksi dan menginduksi chemokin-chemokin seperti CXCL9, 10, dan 11 yang menginduksi migrasi sel ke granuloma. IL-2 yang diproduksi CD8+ digunakan untuk proliferasi sel T (Qin S, *et al.*, 2021).

M.tuberculosis juga menginduksi makrofag untuk mengekspresikan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ke membrane ekstraseluler. VEGF merupakan komponen utama dalam pembentukan granuloma

tuberkulosis. Proses ini termasuk di dalamnya angiogenesis, akumulasi monosit, perekrutan makrofag serta reaksi inflamasi. VEGF berfungsi dalam pembentukan pembuluh darah dan permeabilitas vaskuler dalam proses yang dinamakan angiogenesis (Polena H, *et al.*, 2016).

Granuloma Tuberkulosis tersusun atas massa yang berisi makrofag yang berdiferensiasi menjadi multinucleated giant sel, epitelioid cell dan makrofag berisi droplet lipid dan neutrophil. Sel kemudian terselubungi oleh limfosit, yang terdiri dari sel T CD4+, sel T CD8+ dan sel B serta fibroblast yang membentuk kapsul fibrosis peripheral. Lesi yang disebabkan oleh akan menyebabkan berbagai kerusakan pada paru-paru serta memfasilitasi penyebaran *M. tuberculosis* ke organ-organ yang lain di luar paru-paru. Pada kondisi ini, pasien akan berada pada fase laten TB dan hanya 5-10% individu yang berkembang menjadi TB aktif dalam beberapa tahun setelah terjadinya infeksi awal. *M.tuberculosis* dapat bertahan selama bertahun-tahun tanpa menunjukkan gejala pada pasien (Matty MA, *et al.*, 2015).

B. Bakteri 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 *Mycobacterium tuberculosis* menurut (Gordon & Parish, 2018):

Phylum : Actinobacteria
Class : Actinobacteria
Ordo : Actinomycetales
Family : Mycobacteriaceae
Genus : Mycobacterium
Spesies : *Mycobacterium tuberculosis*

1. Morfologi

Mycobacterium tuberculosis adalah basil aerob yang tumbuh lambat, kemoorganotropik, tidak bergerak, dan tidak membentuk spora, sel berbentuk batang lurus dengan ukuran panjang 2-4 μm dan 0,2-0,5 μm , memiliki bentuk dinding sel yang mirip dengan gram positif tetapi memiliki lapisan lipid yang tebal. Kultur *Mycobacterium tuberculosis* diinkubasi dengan suhu 37°C dengan suasana aerob selama 4-6 minggu koloni tumbuh berbentuk granula, kasar, berbintil-bintil, dan kering (Batt *et al.*, 2020).



Gambar 2. Sel *M. tuberculosis* (Wahdi, A dan Dewi., 2021)

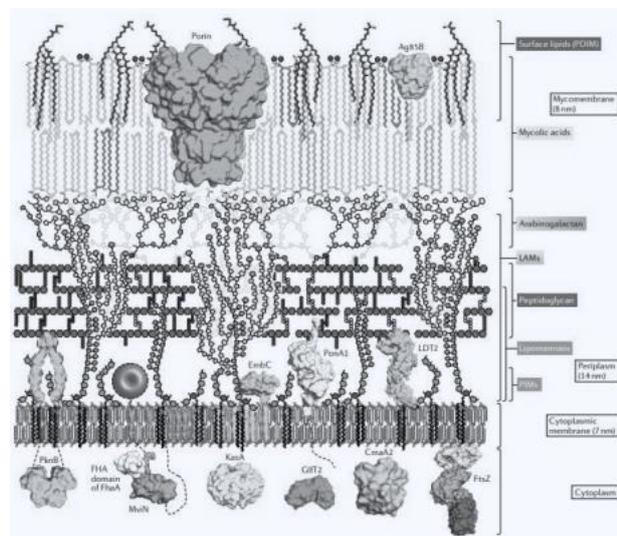
Koloni *Mycobacterium tuberculosis* divisualisasikan melalui pewarnaan tahan asam Ziehl-Neelsen, dimana dinding selnya yang tebal dan berlilin mempertahankan noda karbol-fuschin dari pencucian asam-alkohol. Tes biokimia, termasuk niasin positif dan kemampuan untuk mereduksi nitrat digunakan untuk membedakannya dari mikobakteri lain, meskipun dalam banyak kasus telah digantikan oleh analisis lokus genetik spesifik berbasis PCR (Gordon & Parish., 2018).

Pada media cair pertumbuhannya pleomorfik secara morfologi dapat berupa sel bentuk batang tunggal atau sebagai filament multiseluler dan bercabang dengan waktu generasi > 24 jam, sedangkan spesies yang avirulen seperti *Mycobacterium smegmatis* pertumbuhannya cepat waktu generasi > 3-4 jam (Geffken., 2015).

2. Struktur Dinding Sel

Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* merupakan karakteristik dari *Mycobacteria*. 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).

Asam mikolat adalah komponen yang paling penting dalam dinding sel *M. tuberculosis* yang mencakup 50% berat kering sel, bersifat hidrofobik kuat yang membentuk lapisan lipid sebagai pelindung. Asam mikolat berkolerasi terhadap membran dan menjadi faktor virulensi pada *M. tuberculosis* (Batt *et al.*, 2020).



Gambar 3. Struktur dinding sel *M. tuberculosis* (Boutte., 2019).

Pada gambar ditunjukkan dinding sel *Mycobacteria*, nampak sejumlah protein berikatan dengan peptidoglikan terletak diantara membran dan peptidoglikan. Polisakarida arabinogalaktan terikat pada bagian luar peptidoglikan melalui rangkaian fosfodiester glikosil-ramnosa (α -L-Ramnose). Rangkaian ini terdiri atas α -LRhap-GlcNac-I-fosfat. Arabinogalaktan terdiri atas rantai α -D-Araf yang berikatan dengan C5 dari β -D-Galf. Peptidoglikan sangat penting untuk kelangsungan hidup sel bakteri di sebagian besar lingkungan, sehingga menjadikannya target yang baik untuk terapi anti infeksi (Maitra *et al.*, 2019).

C. Multidrug Resistance Tuberkulosis

Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) didefinisikan sebagai TB yang resistan terhadap setidaknya isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF). Resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) terjadi karena mutasi pada gen *M. tuberculosis*. Mutasi sering disebabkan oleh inadekuatnya kadar terapeutik obat, terutama akibat ketidakpatuhan dalam proses mengonsumsi obat. Lina et al pada tahun 2009 dalam penelitiannya menyatakan bahwa resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode/menyandi target OAT (Vilchèze and Jacobs., 2019).

Akibatnya, dampak dari peningkatan MDR-TB dan relatif terbatasnya jumlah agen terapeutik yang ada, maka dilakukan upaya untuk menentukan dasar molekuler resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT, agar resistensi tertentu terhadap obat anti tuberkulosis dapat segera diketahui dan penderita dapat diterapi dengan pengobatan yang sesuai secara cepat dan tepat (Vilchèze and Jacobs., 2019).

Didapati bahwa resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT adalah karena mutasi genomik tertentu pada beberapa gen spesifik *M. tuberculosis*. Sampai saat ini didapat sembilan mutasi gen yang diketahui terkait dengan resistensi terhadap OAT lini pertama antara lain KatG, InhA, AphC, dan KasA untuk resistensi isoniazid; RpoB untuk resistensi rifampisin; RpsL dan Rss untuk resistensi streptomisin; EmbB untuk resistensi etambutol; dan PncA untuk resistensi pirazinamid. MDR-TB

adalah akibat akumulasi dari mutasi-mutasi tersebut (Vilchèze and Jacobs., 2019).

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 (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

2. Resistansi intrinsik (innate drug resistance)

Resistansi 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, glukan, dan sedikit lipid. Dinding sel terdiri dari mikomembran luar (MM),

arabinogalaktan (AG) dan peptidoglikan dalam (PG) (Iacobino *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020).

Diasumsikan bahwa lapisan hidrofilik terdalam dari PG dan AG menghambat penetrasi molekul hidrofobik. Sebaliknya di bagian luar amplop, lapisan PG dan AG terkait dengan lapisan MA 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 molekul hidrofobik, yang meliputi antibiotik seperti rifamisin, golongan makrolida, golongan fluoroquinolon dan tetrasiklin (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).

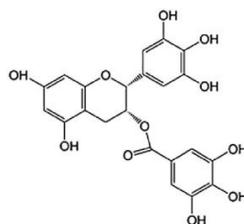
c. Mekanisme lain

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).

D. Epigallokatekin Galat (EGCG)



Gambar 4. Struktur senyawa epigallokatekin-galat (EGCG) (Musial, C *et al.*, 2020).

Epigallokatekin Galat (EGCG) adalah salah satu jenis katekin dari senyawa flavonoid yang termasuk dalam kelompok polifenol yang ditemukan dalam teh hijau (*Camellia sinensis* L). Secara struktural, EGCG terdiri dari cincin benzena dengan beberapa gugus hidroksil yang melekat pada rangkaian karbon. Struktur kimianya dapat digambarkan secara simbolis dengan rumus molekul C₂₂H₁₈O₁₁ (Musial, C *et al.*, 2020).

EGCG telah dikaitkan dengan banyak manfaat kesehatan termasuk antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antimikroba. EGCG juga paling efektif sebagai sifat anti infeksi, yaitu melawan virus, bakteri, dan jamur. Katekin teh hijau khususnya yang mengandung epigallokatekin galat menunjukkan aktivitas antibakteri yang luas terhadap bakteri gram positif dan gram negatif melalui berbagai mekanisme, termasuk penghambatan sintesis dinding sel dan membran sel, sintesis protein dan asam nukleat atau penghambatan jalur metabolisme, seperti racun dan faktor virulensi

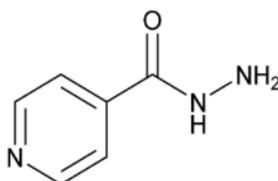
matriks ekstraseluler, stres oksidatif, kelasi besi, dan sebagainya (Siriphap, A *et al.*, 2022).

Mekanisme kerja epigallocatekin galat (EGCG) berhubungan dengan gangguan membran pada sel bakteri seperti mengikat membran sel bakteri, merusak membran sel bakteri, menghambat kemampuan bakteri untuk berikatan dengan sel inang, menghambat kemampuan bakteri membentuk biofilm, dan mengganggu transporter membran bakteri (Siriphap, A *et al.*, 2022).

Aktivitas antimikroba dari ekstrak teh dapat terjadi karena adanya ikatan kuat antara muatan negatif dari EGCG dengan muatan positif pada lapisan *lipid bilayer* pada bakteri Gram-positif. Senyawa katekin berpartisipasi ke dalam membran *lipid bilayer* yang menyebabkan struktur dan fungsi sel bakteri menurun, sehingga akhirnya mengakibatkan kematian sel bakteri tersebut (Steinmann, J *et al.*, 2013).

Secara *in vitro*, epigallocatekin galat (EGCG) menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* (konsentrasi 150 µg/mL), penghambatan *M. tuberculosis* diperkirakan menjadi jalur mekanisme farmakologis senyawa EGCG sebagai antituberkulosis (Mirzautika *et al.*, 2020).

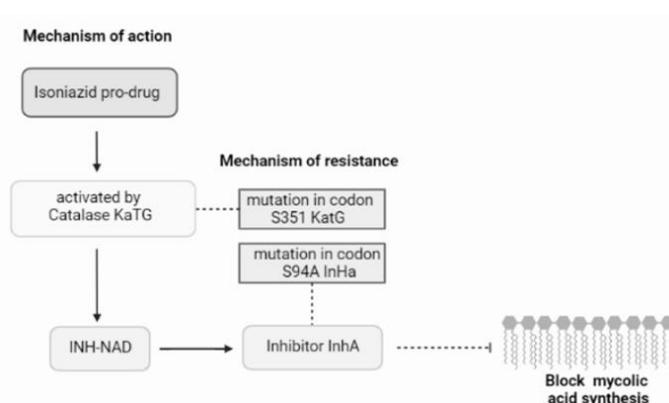
E. Isoniazid (INH)



Gambar 5. Struktur Isoniazid (P. Hegde *et al.*, 2021).

Isoniazid (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. Selama 2 hari pertama pengobatan INH membunuh sekitar 90% bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Goossens *et al.*, 2021).



Gambar 6. Mekanisme aksi dan mekanisme resisten isoniazid

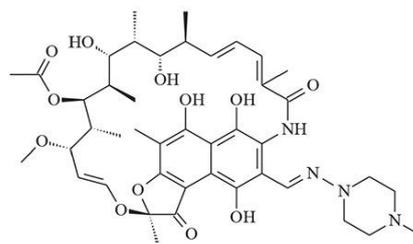
Resistensi *M. tuberculosis* terhadap INH sebagian besar disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi KatG yang mengubah ekspresi enzim KatG dan mencegah pembentukan kompleks INH-NAD. Mutasi gen resisten terhadap isoniazid antara lain katG, inhA, ahpC, kasA, dan NDH. Mutasi gen katG yang paling sering terjadi 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 (Bashir A. Sheikh *et al.*, 2022).

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).

Isoniazid dengan cepat membunuh pertumbuhan aktif *Mycobacterium tuberculosis* dengan menghambat sintesis asam mikolat, menghancurkan integritas dinding sel bakteri. Isoniazid merupakan komponen penting dari rejimen obat untuk infeksi TB laten dan penyakit TB aktif. INH tetap ada dalam daftar obat esensial WHO untuk anak-anak dan orang dewasa dan dapat digunakan untuk terapi TB bahkan dalam kasus dimana kehamilan dan HIV mungkin menjadi faktor penyulit.

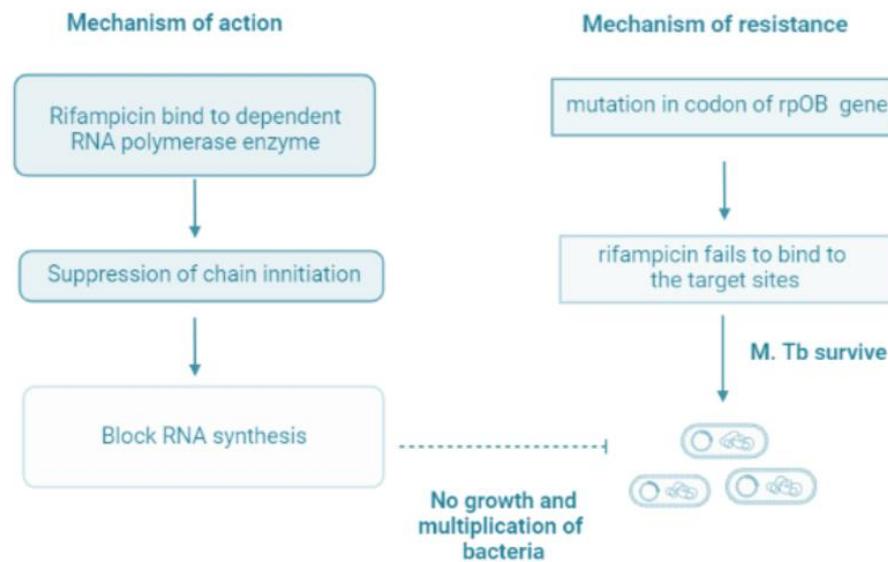
Resistensi INH sangat terkait dengan kegagalan pengobatan selanjutnya, kekambuhan dan resistensi multidrug yang didapat dan mendahului perolehan resistensi terhadap sebagian besar obat antimikroba lainnya. Jika kerentanan terhadap INH menentukan keberhasilan atau kegagalan kemoterapi TB dan perolehan resistensi terhadap obat lain, alat diagnostik masa depan harus berusaha untuk mengoptimalkan sensitivitas dan spesifisitas untuk membatasi kasus dimana resistensi INH salah didiagnosis (Kandler *et al.*, 2018).

F. Rifampisin (RIF)



Gambar 7. Struktur Rifampisin (Kul D., 2020).

Rifampisin (RIF) adalah salah satu obat anti tuberkulosis yang paling penting. Aktivitas bakterisidanya yang sangat efektif melawan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) telah menjadikannya obat utama dalam pengobatan TB. Rifampisin menghambat RNA polimerase dengan berinteraksi dengan sub unit dari enzim sehingga menghambat proses transkripsi dengan menghalangi langkah pemanjangan, mencegah sintesis protein dan membunuh bakteri (Yelamanchi, S.D *et al.*, 2022).



Gambar 8. Mekanisme aksi dan mekanisme resisten rifampisin

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).

Rifampisin menargetkan sub unit RNA polimerase yang bergantung pada DNA, dikodekan oleh gen *rpoB*. Gen *rpoB* yang bermutasi membawa perubahan konformasi yang relevan dengan afinitas pengikatan RIF pada sub unit dari RNA polimerase (RNAP) dan akibatnya

obat menjadi tidak aktif tanpa pengikatan yang tepat ke situs target. Sekitar 90-95% isolat resisten RIF telah terbukti menyimpan mutasi dalam gen *rpoB* dan resistensi RIF sebagian besar terkait dengan mutasi pada 81-bp fragmen gen *rpoB* yang terletak di antara kodon *rpoB* 426 dan 452 pada *M. Tuberculosis* (Li Ma chao., 2021).

G. 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 (Hartini *et al.*, 2018).

1. 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).

2. Lowenstein Jensen

Media Lowenstein Jensen (LJ) merupakan modifikasi International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) yang saat ini digunakan secara luas untuk kultur 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).

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).

H. Metode Pengujian Aktivitas Antituberkulosis

1. Metode Konvensional

a. Metode Proporsi

Merupakan metode yang paling banyak digunakan diantara metode konvensional yang lain. Metode ini dapat menghasilkan determinasi yang tepat dari proporsi mutan yang resisten terhadap obat tertentu. Metode ini beberapa larutan bakteri serial dengan pengenceran 100 kali, diinokulasi pada media yang mengandung obat dan media yang bebas obat (kontrol).

Satu dari larutan tersebut akan menghasilkan sejumlah koloni yang mudah untuk dihitung. Jumlah koloni yang didapat dari media tersebut dihitung dan proporsi dari mutan yang resisten dapat dikalkulasi. Jika dilakukan pada media Lowenstein-Jensen, hasil tes dibaca pertama kali setelah inkubasi selama 28 hari pada suhu 37°C. Isolat dengan resistensi minimal 1% akan dilaporkan sebagai resisten terhadap konsentrasi obat tersebut. Jika proporsi bakteri yang resisten lebih dari 1% untuk isoniazid, rifampisin, asam para-aminosalisilat dan 10% untuk jenis obat lain, strain dianggap resisten dan tes dikatakan selesai. Tes dibaca kembali pada hari ke 42 inkubasi untuk menilai kembali jika strain sensitif untuk beberapa obat. Jika tes dilakukan pada agar Middle brook 7H10/11, diinkubasi pada suasana CO₂ 10%. Hasil dibaca setelah 21 hari inkubasi atau dapat lebih awal jika menunjukkan strain yang cenderung resisten (Sharma S.K and A. Mohan, 2004).

b. Metode Konsentrasi Absolut

Pada metode konsentrasi absolut, Kadar Hambat Minimum (KHM=MIC) dari obat ditentukan dengan menginokulasikan pada media kontrol dan media yang mengandung obat dengan isolat *M. tuberculosis* dengan seksama dan terkontrol. Media mengandung beberapa urutan pengenceran dua kali serial dari setiap obat yang digunakan. Konsentrasi obat yang digunakan pada media sama dengan pada metode proporsi. Resistensi ditunjukkan dengan konsentrasi terendah dari obat yang dapat menghambat pertumbuhan (ditegaskan dengan 20 koloni atau lebih pada

akhir minggu keempat). Sebuah strain dianggap sensitif jika jumlah koloni dari media yang mengandung obat kurang dari 20 dengan pertumbuhan (Sharma S.K and A. Mohan, 2004).

c. Metode Rasio Resistensi

Metode rasio resistensi membutuhkan ukuran inokulum yang rinci sehingga kurang optimal jika dilakukan secara langsung dari spesimen klinik meskipun terkonsentrasi. Pembacaan hasil tes dilakukan setelah 4 minggu inkubasi pada 37°C. Tabung yang mengandung 20 atau lebih koloni ditetapkan sebagai positif tumbuh dan MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari obat yang ditumbuhi koloni kurang dari 20. Isolat dengan nilai rasio resistensi ≤ 2 dianggap sensitif sedangkan rasio resistensi ≥ 8 didefinisikan sebagai resisten (Sharma S.K and A. Mohan, 2004).

2. Metode Modern

a. Metode Radiometri BACTEC

Metode ini berdasarkan sistem komersial BACTEC TB 460 yang menggunakan media cair Middlebrook 7H9 yang diperkaya mengandung 14C berlabel asam palmitat sebagai sumber karbon tunggal (vial 12B). Pertumbuhan dari mycobacteria dan konsumsi dari asam lemak yang diberi label akan menghasilkan 14 CO₂ yang dideteksi didalam vial 12 B oleh perangkat BACTEC dan diekspresikan sebagai index pertumbuhan. Dalam kondisi obat tertentu, sensitifitas dapat diukur melalui inhibisi peningkatan index pertumbuhan harian. Untuk menjalankan pemeriksaan

ini, tabung tes mengandung obat yang akan diuji dan kontrol bebas obat diinokulasi dengan inokulum dan diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung kemudian akan dibaca oleh perangkat BACTEC TB 460 setiap hari. Dua tabung kontrol yang diinokulasi dengan inokulum pengenceran 100 kali, hasil dapat diinterpretasikan sebagai metode proporsi dengan 1% proporsi pertumbuhan (Sharma S.K and A. Mohan, 2006).

BACTEC telah disetujui oleh FDA-US dan dipertimbangkan menjadi baku emas untuk uji kepekaan terhadap OAT lini pertama. Keuntungan utama dari metode radiometri BACTEC ini adalah kapasitas untuk mendeteksi resistensi OAT dengan lebih cepat daripada metode berbasis medium padat, sedangkan kelemahannya adalah biaya dan kebutuhan adanya penanganan limbah radioaktif dari tabung yang sudah digunakan (Sharma S.K and A. Mohan, 2006).

b. BACTEC MGIT 960

BACTEC MGIT 960 merupakan teknik pemeriksaan biakan dengan media cair. Metode lebih akurat, sensitif dan cepat mendeteksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan media padat. Biakan media cair BACTEC MGIT 960 dapat dilakukan secara manual ataupun otomatis dengan BACTEC MGIT 960. Tabung kultur BACTEC MGIT 960 berisi 7 ml Middle brook 7H10, 0,5 ml Oleic acid, Bovine Albumin, Dekstrose, Catalase, (OADC) dan 0,1 ml campuran antibiotik Polymixin B, Amphotericin B, Nalidixid Acid, Trimetoprim, Azlocillin (PANTA) untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain (Diriba *et al*, 2017).

Tabung kultur berisi sensor fluoresen yang mendeteksi konsentrasi oksigen dalam media kultur. Tingkat fluoresensi sesuai dengan jumlah oksigen yang dikonsumsi oleh organisme dalam spesimen yang diinokulasi sebanding dengan jumlah bakteri yang ada. Ketika tingkat fluoresensi tertentu tercapai, instrumen menunjukkan bahwa tabung positif. Setelah inokulasi setiap tabung dengan 0,5 ml spesimen yang diproses, tabung diinkubasi pada 37°C dalam instrumen BACTEC MGIT 960 dan dipantau secara otomatis setiap 60 menit untuk peningkatan fluoresensi. Tabung kultur dipertahankan sampai menjadi positif atau selama 42 hari untuk sampel negatif. Sampel yang ditemukan positif dikeluarkan dari instrumen kemudian dikulturkan pada plat agar Brain Heart Infusion, diinkubasi selama 48 jam pada 37°C untuk menilai kemungkinan kontaminan (Diriba *et al*, 2017).