

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan utama di negara tropis yang sedang berkembang seperti Indonesia. Berdasarkan *Global TB Report 2021*, Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang paling banyak menyebabkan kematian, sekitar seperempat penduduk di dunia telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Kondisi ini diperparah dengan adanya pandemi *corona virus disease-19* (COVID-19), TB menjadi penyebab utama kematian karena penyakit infeksi. Indonesia berada pada peringkat ke dua di Dunia dalam jumlah kasus tuberkulosis terbesar berdasarkan *Global TB Report 2021*. Hal ini memberikan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Tuberkulosis merupakan penyebab kematian tertinggi setelah penyakit jantung iskemik dan penyakit serebrovaskuler (Kemenkes RI, 2020).

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) memiliki keunikan, karena bakteri hidup intraseluler. *Mycobacterium tuberculosis* menginvasi ke dalam tubuh inang, kemudian dapat bersembunyi di dalam makrofag yang tidak dapat memfagositosis bakteri tersebut, karena belum teraktifkan. Hal ini menjadi salah satu faktor yang mempersulit pengobatan infeksi M.tb. *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler mampu menghindari dari aktifitas enzim lisosom, fagositosis, *reactive oxygen intermediate* (ROI), dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) yang mampu membunuh M.tb melalui interaksi khusus *progresive acidification* diikuti oleh fusi dengan lisosom. Bakteri ini mampu menunda atau menghambat fusi dari lisosom dan fagosom (Kumar *et al.*, 2010).

Mycobacterium tuberculosis mampu hidup intraseluler, sehingga yang paling berperan terhadap eradikasi bakteri tersebut adalah sistem imun seluler. Sel T adalah komponen penting dari respon imun seluler terhadap M.tb, terutama limfokin Interferon gamma (IFN- γ) yang telah terbukti sebagai mediator penting untuk mengaktivasi makrofag dalam mengendalikan sejumlah patogen intraseluler (Flynn, 2004).

Penggunaan imunomodulator mulai dikembangkan dalam mengatasi TB, terutama M.tb yang resisten. Bakteri probiotik seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus*, *Bifidobacteria* adalah komponen penting dari mikroflora normal dalam saluran cerna hewan dan manusia. Bakteri tersebut telah dilaporkan dapat berperan sebagai imunomodulator melalui aktivitasnya sebagai antimikroba dan sebagai mediator aktivitas *pro-inflammatory Th 1-cytokines* (IL-12, TNF- α , IFN- γ), anti inflamasi dan *oral tolerance* yang diinduksi oleh *Th2-cytokines* (IL-10 dan TGF- β), menstimulasi imun adaptif lokal dan sistemik (IgG dan IgA) (Gackowska *et al.*, 2006). Penelitian sebelumnya terkait peran probiotik terhadap kadar TNF- γ pasien TB pernah dilakukan oleh Ghadimi *et al* (2010), yaitu kombinasi antigen M.tb dengan *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) atau *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 (B.d) menyebabkan terjadinya peningkatan sinergis TNF- γ pasien TB. Penelitian lain pernah dilakukan oleh Halim and Zubaidah (2013), probiotik mampu mensintesis eksopolisakarida (EPS) yang menempel pada mukosa usus halus, sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen dan meningkatkan sistem imun tubuh. Pemberian *mix cultured* probiotik (*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.bulgaricus*, *B.bifidum*, *B.animalis*, *L.plantarum*, *S.thermophilus*) dilaporkan

mampu meningkatkan sekresi IFN- γ pada PBMC pasien TB anak (Rosyidah *et al.*, 2020).

Hadirnya IFN- γ memperkuat potensi fagosit dari makrofag dengan menstimulasi fusi fagolisosom dan pembentukan ROI dan RNI yang dapat menghancurkan bakteri M.tb (Widjaja, 2010). *Mycobacterium tuberculosis* pada makrofag akan memberi sinyal, sehingga retikulumendoplasmik memproduksi molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II. Molekul ini akan membawa fragmen M.tb yang diproses oleh makrofag ke permukaan makrofag dan dipaparkan, sehingga dikenali dan diikat oleh reseptor limfosit-T CD4+. Sel limfosit-T CD4+ teraktivasi akan memproduksi sitokin yang berperan penting dalam menghancurkan atau mengontrol pertumbuhan M.tb. Salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel T-CD4+ adalah IFN- γ yang berperan penting dalam mengeliminasi M.tb. Sitokin IFN- γ memperkuat potensi fagosit makrofag yang terinfeksi M.tb, yaitu dengan cara menstimulasi pembentukan fagolisosom dan menstimulasi pembentukan radikal bebas yang dapat menghancurkan komponen M.tb. IFN- γ akan merangsang makrofag yang mengandung M.tb untuk meningkatkan *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) yang diperlukan untuk menghancurkan M.tb (Abbas *et al.*, 2014). Oleh karena itu, evaluasi kadar IFN- γ pada pasien TB sebagai parameter sistem imun sangat penting.

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) adalah setiap sel darah tepi yang memiliki inti bulat terdiri dari limfosit (sel T, sel B, sel *Natural Killer* (NK)) dan monosit. Eritrosit dan trombosit tidak memiliki nuklei, dan granulosit (neutrofil, basofil, dan eosinofil) memiliki nukleus yang memiliki banyak lobus. Pada manusia, limfosit merupakan mayoritas populasi PBMC, diikuti oleh

monosit, dan hanya sebagian kecil dari sel dendrit (Warnasih *et al.*, 2016). Oleh karena itu, untuk mengidentifikasi sitokin sel T yaitu IFN- γ dapat dilakukan dengan mengisolasi PBMC.

Probiotik adalah mikroorganisme hidup (sebagian besar adalah berupa bakteri) yang jika dikonsumsi dapat memberikan keuntungan bagi kesehatan dengan menjaga dan memperbaiki keseimbangan mikroorganisme di dalam usus (Zendeboodi *et al.*, 2020). Probiotik dapat menghasilkan berbagai senyawa yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen, meliputi asam organik (asam laktat dan asam asetat), bakteriosin, dan reuterin. Asam organik tidak hanya menurunkan pH yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri patogen, tetapi juga bisa menjadi racun bagi mikroba patogen (Pundir *et al.*, 2013).

Pemberian probiotik secara oral akan meningkatkan sistem imun melalui interaksi dengan sel epitel usus (*intestinal epithelial cells/* IECs) atau sel kekebalan yang terkait dengan lamina propria, melalui *Toll like receptors* (TLRs), dan menginduksi produksi berbagai sitokin atau kemokin. *Macrophage chemoattractant protein 1*, diproduksi oleh IECs, mengirimkan sinyal ke sel imun lain yang mengarah ke aktivasi *mucosal immune system* (MIS), ditandai dengan peningkatan sel imunoglobulin A⁺ pada usus, bronkus dan payudara. kelenjar, dan aktivasi sel T. Secara khusus, probiotik mengaktifkan sel T regulator yang melepaskan IL-10. Probiotik memperkuat penghalang usus dengan peningkatan musin dan Sel *Paneth*, sehingga dapat memodulasi mikrobiota baik di usus dengan menekan pertumbuhan bakteri patogen potensial di usus. Oleh karena itu, interaksi probiotik dengan IEC, makrofag dan sel dendrit (DC) berperan penting dalam respon imun ini tanpa menyebabkan pola inflamasi (Galdeano *et al.*, 2019).

Probiotik alami dapat ditemukan pada saluran cerna manusia dan hewan, sayur-sayuran dan buah-buahan (Halim and Zubaidah, 2013), salah satunya adalah buah markisa. Berdasarkan penelitian Zahro (2014), buah markisa ungu (*Passiflora edulis* Sims. var *edulis*) mengandung *L.bulgaricus* dan *L.heterohiochii*. Buah markisa (*Passiflora edulis*), anggota keluarga Passifloraceae, memiliki lebih dari 500 spesies (Paull dan Duarte, 2012; Reis *et al.*, 2018). Tanaman ini berasal dari Brasil dan telah tersebar ke negara-negara lain di Asia, Australia, Afrika, India, Amerika Selatan, dan Karibbean. Markisa memiliki varian lain yang dapat diidentifikasi dari warna buahnya (Reis *et al.*, 2018), seperti kuning (*P. edulis* var. *Flavicarpa*), ungu atau merah (*P. edulis* var.*edulis*), dan oranye (*P. edulis* var. *Caerulea*).

Buah markisa memiliki banyak kandungan metabolit sekunder diantaranya glikosida flavonoid (Ingale dan Hivrale, 2010), luteolin-6-C-chinovoside, luteolin-6-C-fucoside, glikosida sianogenik passibiflorin, epipassibiflorin, passicapsin, passicoriacin, epipassicoriacin, cyanogenic-b-rutinoside, epitetraphilin B, amygdalin, prunasin, glikosida triterpenoid dan glikosida salisilat. Senyawa kimia lain seperti b-karbolin alkaloid harman, harmine, harmaline dan harmalol, fenol, karoten dan g-lakton juga ditemukan dalam buah markisa (Bernes *et al.*, 2007). Buah markisa adalah buah yang memiliki nilai gizi tinggi banyak kandungan multimineral seperti magnesium dan pospor, berbagai vitamin, serta karbohidrat dan air (Zibadi & Watson, 2004). Buah markisa memiliki kandungan nutrisi yang memadai sehingga merupakan habitat yang cocok untuk pertumbuhan bakteri probiotik. Buah markisa yang kaya manfaat bagi kesehatan ini belum banyak dikembangkan lebih lanjut di bidang

farmasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi probiotik dari daging buah markisa merah.

Aktivitas antibakteri supernatan fermentasi sel bebas (*Cell Free Fermentation Supernatan/ CFFS*) buah markisa kuning (*Passiflora edulis forma flavicarpa* Sims.) yang difermentasi dalam media *de Man-Rogosa Sharpe Broth* (MRS-B) telah dilaporkan aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus* spp., *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), dan *Extended Strain Beta Lactamase* (ESBL) *Escherichia coli* (Marwah *et al.*, 2020). Filtrat hasil fermentasi *pulp* buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) dalam media MRS-B telah dilaporkan aktivitasnya terhadap *Escherichia coli extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) and *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Nurrosyidah, *et al.*, 2020).

Pada penelitian ini akan dilakukan analisis kadar IFN- γ pada PBMC pasien tuberkulosis dengan pemberian *multistrain* probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) yang diperoleh dari daerah Krembung Kabupaten Sidoarjo Jawa Timur. Bakteri probiotik diisolasi dari biji buah markisa merah yang sudah masak, kemudian diidentifikasi secara biokimia, dan identifikasi 16s rRNA . Isolat bakteri kemudian diuji karakteristik probiotiknya yang mengacu pada WHO (2002) yang meliputi uji ketahanan asam (pH), uji ketahanan garam NaCl, uji sensitivitas terhadap antibiotik *Vancomycin* (inhibitor pembentukan dinding sel bakteri) dan antibiotik *erythromycin* (inhibitor pembentukan protein), dan uji antibakteri terhadap bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Escherichia coli extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) and *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Isolat bakteri yang memiliki karakteristik sebagai probiotik kemudian diuji kompatibilitasnya. Biomassa isolat probiotik yang potensial dan kompatibel kemudian diujikan terhadap PBMC pasien TB untuk dianalisa kadar IFN- γ menggunakan *Elisa-Kit*.

Keterbaruan penelitian ini adalah diperoleh probiotik *strain* baru dari buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) yang mampu meningkatkan kadar IFN- γ pada *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) pasien TB dewasa secara *in vitro* (1), diperoleh *multistrain* probiotik yang kompatibel (2), diperoleh *multistrain* probiotik yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen secara *in vitro* (3).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas diperoleh rumusan masalah sebagai berikut;

1. Apakah isolat bakteri dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) memiliki karakter probiotik sesuai WHO (tahan terhadap pH asam, tahan terhadap garam, tahan terhadap senyawa antibakteri, dan mampu menghambat bakteri patogen)?
2. Apakah probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) termasuk *strain* baru berdasarkan identifikasi 16s rRNA?
3. Apakah probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) kompatibel jika dicampur antar isolat?
4. Apakah probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen

Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *Escherichia coli* extended-spectrum beta-lactamase (*E. coli* ESBL) and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*?

5. Apakah probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) efektif meningkatkan kadar IFN- γ dalam PBMC pasien TB dewasa?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah menganalisis kadar IFN- γ pada *peripheral blood mononuclear cell* pasien tuberkulosis dewasa setelah pemberian *multistrain* probiotik dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.).

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah ;

1. Melakukan Isolasi dan karakterisasi probiotik sesuai WHO isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) yang meliputi uji ketahanan terhadap pH asam, garam NaCl, dan terhadap senyawa antibakteri serta kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen.
2. Menetapkan *strain* baru probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) berdasarkan 16s rRNA.
3. Mengevaluasi kompatibilitas probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.).
4. Mengevaluasi kemampuan probiotik isolat dari probiotik dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) dalam menghambat

pertumbuhan bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Escherichia coli* extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*.

5. Mengevaluasi pengaruh probiotik isolat dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) terhadap kadar IFN- γ dalam PBMC pasien TB dewasa.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah;

1. Diperoleh sumber isolat probiotik potensial *strain* baru galur lokal dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) yang mampu meningkatkan kadar IFN- γ dalam PBMC pasien TB dewasa secara *in vitro*, sehingga dapat dikembangkan sebagai suplemen kesehatan bagi pasien TB selama pengobatan.
2. Diperoleh sumber isolat probiotik potensial *strain* baru galur lokal dari biji buah markisa merah (*Passiflora edulis* Sims.) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sehingga dapat dikembangkan sebagai alternatif sumber antibakteri baru.
3. Memberikan nilai tambah kepada buah markisa (*Passiflora edulis* Sims.) yang selama ini kurang dimanfaatkan karena memiliki rasa yang asam, yaitu sebagai alternatif sumber probiotik baru galur lokal.