

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit infeksi tertua yang dikenal dalam dunia kedokteran, namun sampai sekarang infeksi ini tetap merupakan masalah serius di banyak negara di dunia. Indonesia sendiri menempati peringkat ke-3 setelah India dan China dari 22 negara di dunia dengan jumlah penderita TB terbanyak (Yuniarti, 2010).

World Health Organization (WHO) telah mengembangkan enam strategi *stop TB* yang dibangun di atas keberhasilan *Directly Observe Treatment Shortcourse* (DOTS) dan secara eksplisit menunjukkan bahwa tantangan utama yang dihadapi TB. Tujuannya adalah untuk mengurangi beban global TB pada tahun 2015 dengan memastikan semua pasien TB, termasuk misalnya, mereka terinfeksi dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan mereka yang resistan terhadap obat TB, manfaat dari akses universal untuk diagnosis berkualitas tinggi dan berpusat pada pengobatan pasien. Strategi ini juga mendukung pengembangan alat-alat baru dan efektif untuk mencegah, mendeteksi dan mengobati TB (WHO, 2014).

Tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) yang paling sering mempengaruhi paru-paru. Tuberkulosis dapat disembuhkan dan dicegah. Kendala pengobatan TB adalah timbulnya resistensi kuman terhadap rifampisin dikaitkan dengan perubahan subunit RNA polimerase (Yuniarti, 2010).

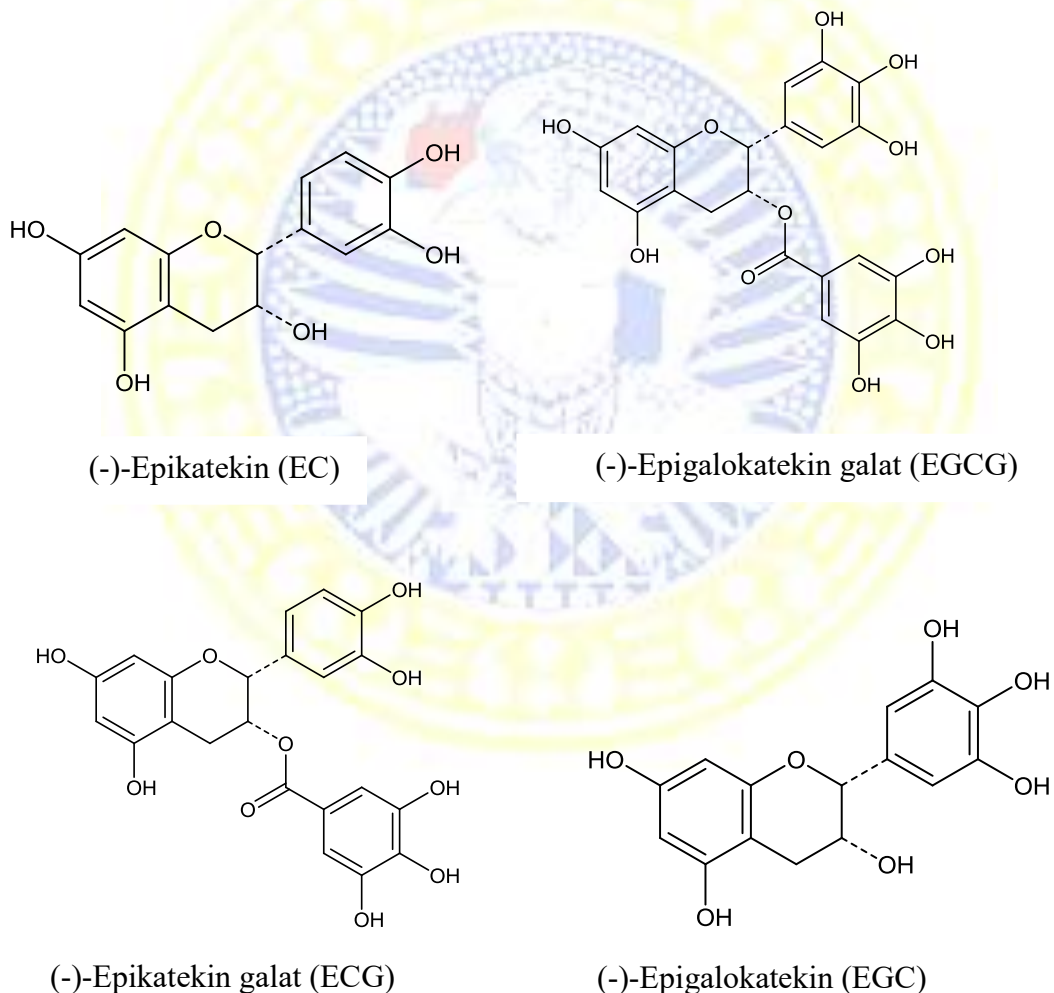
Resistensi obat dari pasien TB harus dijadikan pertimbangan dalam memilih obat yang tepat. Efektifitas pengobatan menggunakan rifampisin (RIF) sebagai *first line drugs* sering terkendala dengan munculnya resistensi bakteri *M. tuberculosis* terhadap obat anti-tuberkulosis yang diberikan. Dari beberapa penelitian ditemukan kalau resistensi bakteri ini tidak saja terjadi pada salah satu jenis obat anti-tuberkulosis tapi bisa lebih. Kondisi seperti ini dikenal juga dengan istilah *multi-drug resistance* (MDR). Karena kombinasi INH dan RIF merupakan kemoterapi utama dalam penanganan awal infeksi *M. tuberculosis*, maka khusus untuk TB, MDR didefinisikan sebagai resistensi bakteri *M. tuberculosis* terhadap minimal RIF dan isoniazin (INH) (Yuniarti, 2010).

Kemungkinan terjadinya resistensi tunggal bakteri terhadap RIF lebih jarang dibanding INH. Dengan kata lain jika bakteri *M. tuberculosis* sudah diketahui resisten terhadap RIF maka sangat besar kemungkinan juga sudah resisten terhadap INH, artinya bakteri ini sudah mengalami MDR. Berdasarkan hal tersebut maka WHO menetapkan resisten RIF sebagai penanda terjadinya MDR (Yuniarti, 2010).

Pengobatan primer untuk infeksi *M. tuberculosis* adalah kemoterapi spesifik. Dua obat utama untuk mengobati tuberkulosis adalah isoniazid dan RIF. Obat lini pertama lainnya adalah pirazinamid, etambutol, dan streptomisin. Regimen standar 9 bulan yang berdasarkan pada INH dan RIF yang diberikan setiap hari, pirazinamid, etambutol, atau streptomisin diberikan secara bersamaan sampai ada hasil uji sensitivitas. INH dan RIF dapat diberikan selama 1-2 bulan dan dua kali seminggu selama sisa 9 bulan, tetapi regimen ini tidak boleh digunakan jika terdapat kemungkinan adanya resistensi obat. Selain itu, juga terdapat beberapa regimen 6 bulan untuk pengobatan awal tuberkulosis yang secara umum menggunakan tiga atau empat

regimen obat selama 2 bulan yang diikuti dengan pemberian INH dan RIF dua kali seminggu untuk keseluruhan 6 bulan (Yuniarti, 2010).

Beberapa produk bahan alam seperti teh hijau (*Camellia sinensis* L. Kunz) mengandung senyawa polifenol yang merupakan konstituen yang paling penting dari teh, mengandung senyawa antimikroba yang efektif, yaitu turunan katekin (Yi, *et al.*, 2010). Turunan katekin tersebut adalah (-)-epikatekin (EC), (-)-epigalokatekin (EGC), (-)-epikatekin galat (ECG), dan (-)-epigalokatekin galat (EGCG) (Gambar 1.1).



Gambar 1.1 Struktur senyawa EC, EGC, ECG, dan EGCG (Lu *et al.*, 2011).

Penjelasan yang berbeda untuk mekanisme polifenol teh sebagai antimikroba telah diusulkan. Polifenol teh menunjukkan tindakan penting pada aktivitas antimikroba dengan menggabungkan dengan protein dan menghambat aktivitas enzim. EGC, EGCG dapat menghambat enzim RNA polimerase secara bersaing dengan nukleotida. Aktivitas antimikroba EGCG pada anti-*L. monocytogenes* dalam menghambat aktivitas hemolitik dan kolesterol yang mengikat *listeriolysin O*, sehingga mengganggu membran *phagosomal* ketika keluar dari *L. monocytogenes* (Yi *et al.*, 2010).

Kandungan polifenol teh hijau EGCG memiliki spektrum luas sebagai antimikroba seperti antijamur *Candida spp* (*C. albicans*, *C. glabrata*), dermatofit (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*), antibakteri *methicillin resistant Staphylococcus aureus* dan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp*, *Mycoplasma pneumonia*) dan antivirus *Orthomyxoviridae* (virus Influenza) dan *Flaviviridae* (hepatitis C), virus hepatitis B, *herpes simplex virus*, *Human Immunodeficiency Virus* dan efek adenovirus (Das *et al.*, 2014).

Obat lini pertama anti-tuberkulosis yang digunakan yaitu RIF (Gambar 1.2) karena RIF merupakan obat antiTB lini pertama yang terutama digunakan, dan memiliki frekuensi mutasi terhadap bakteri sebesar > 95% (Alfin, 2008) sehingga perlu dilakukan pengembangan cara pengobatan baru terhadap lini pertama anti-tuberkulosis RIF dikombinasikan dengan senyawa turunan (-)-epikatekin. Secara *in vitro* RIF dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* pada kadar 0,995-0,2 µg/mL (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI, 2007).

Efek antimikroba senyawa katekin yaitu menghancurkan membran sel bakteri, menghambat sintesis asam lemak *fatty acid synthesis* (FAS) dan menghambat aktivitas enzim (Reygaert, 2014).

Aktivitas biologi senyawa turunan (-)-epikatekin terhadap isolat *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* adalah dengan mengikat lemak pada membran sel yang bermuatan negatif dengan menjadi lemak bermuatan positif, menghancurkan struktur membran atau membentuk fragmen pada lapisan lemak menyebabkan kebocoran intramembran (Das *et al.*, 2014).

Mekanisme sinergi kombinasi antara senyawa turunan (-)-epikatekin dan beberapa antibiotik masih belum jelas. Zhao *et al.*, 2001 berhipotesis bahwa yang bertanggung jawab atas efek sinergi, *additive* dan *indifferent* antara senyawa turunan (-)-epikatekin dan beberapa antibiotik kemungkinan karena senyawa turunan (-)-epikatekin dan antibiotik bersinergi menghambat pertumbuhan bakteri karena secara langsung atau tidak langsung dengan menyerang pada target yang sama yaitu dinding sel. Apabila hipotesis ini benar, senyawa turunan (-)-epikatekin akan menunjukkan efek sinergi ketika digunakan bersama dengan antibiotik penghambat biosintesis dinding sel, seperti rifampisin.

Metode aktivitas anti-tuberkulosis dilakukan dengan metode dilusi. Pertumbuhan mikroorganisme ditandai dengan terjadinya kekeruhan dalam tabung sesuai dengan tingkat pengenceran dari senyawa yang diuji dan antibiotika baru (Djide & Sartini, 2008).

Bakteri yang digunakan yaitu *M. tuberculosis* ATCC H37RV. *M. tuberculosis* adalah aerob obligat dan mendapatkan energi dari oksidasi banyak komponen karbon

sederhana. Peningkatan tekanan CO₂ mendukung pertumbuhan. Aktivitas biokimia tidak khas, dan laju pertumbuhannya lebih lambat daripada kebanyakan bakteri. Waktu pembelahan sel tuberkulosis sekitar 18 jam. Bentuk saprofitik cenderung untuk tumbuh lebih cepat, dan berploriferasi dengan baik pada suhu 22-23°C. Bakteri memproduksi pigmen, dan tidak terlalu bersifat tahan asam bila dibanding bentuk patogennya (Brooks *et al.*, 2004).

Hubungan kuantitatif struktur kimia dan aktivitas biologis obat (HKSA) merupakan bagian penting rancangan obat dalam usaha mendapatkan suatu obat baru dengan aktivitas yang lebih besar, selektivitas yang lebih tinggi, toksisitas atau efek samping sekecil mungkin, dan kenyamanan yang lebih besar (Siswandono & Soekardjo, 2000).

Merancang suatu metode pengobatan baru, dapat dilakukan dengan melakukan pendekatan terhadap sifat-sifat fisika kimia dan hubungan struktur kimia dengan aktivitas biologis (*structure activity relationship*). Parameter yang sangat penting dalam menentukan kekuatan interaksi obat-reseptor dibagi menjadi tiga, yaitu parameter lipofilik (log P, ClogP, π dari Hansch, f dari Rekker Mannhold), parameter elektronik (pKa, σ dari Hammett, E_{tot}), dan parameter sterik (Es dari Taft, BM, MR, CMR, dan B1 dari Verloop). Sifat lipofilik/hidrofobik merupakan parameter yang mempengaruhi kemampuan senyawa dalam menembus membran biologis yaitu pada distribusi obat ke reseptor. Sifat elektronik mempengaruhi kekuatan ikatan obat-reseptor dan kemampuan senyawa dalam menembus membran biologis dalam hal bentuk molekul obat. Sifat sterik menentukan keserasian interaksi obat-reseptor (Siswandono & Soekardjo, 2000).

Secara teoritis, bila dihitung dengan menggunakan program komputer *ChemBioDraw Ultra* 11.0, antibiotik RIF memiliki nilai parameter lipofilik (logP) 4,2; parameter elektronik (Etot) 248,472 serta nilai parameter sterik (MR) 213,06, senyawa EC memiliki nilai parameter lipofilik (ClogP) 0,5338; parameter elektronik (Etot) 43,6162 serta nilai parameter sterik (CMR) 7,3324, ECG memiliki ClogP 2,1577; parameter elektronik (Etot) 52,5079 dan CMR 10,8024, EGC memiliki ClogP -0,1332; parameter elektronik (Etot) 45,7159 dan CMR 7,4855 dan EGCG memiliki ClogP 1,4907; parameter elektronik (Etot) 52,4035 dan CMR 10,9555. Dengan demikian, berdasarkan perhitungan nilai parameter sifat fisika kimia, senyawa turunan (-)-epikatekin memiliki sifat lipofilik, energi total elektron dan pengaruh sterik yang lebih kecil dibandingkan RIF.

Strategi dalam mendesain obat secara rasional, terutama pendekatan berbasis *in silico*, telah muncul sebagai alternatif yang menjanjikan dan merupakan alat pelengkap terhadap skrining untuk senyawa yang potensial. Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan proses *docking* molekul kandidat obat terhadap reseptor melalui simulasi komputer. Desain obat baru dengan menggunakan komputer telah diterapkan secara luas di bidang penemuan obat modern, sehingga menghemat waktu dan biaya dalam hal sintesis di laboratorium dan uji aktivitas biologis skala besar. Dengan uji *in silico* dapat digambarkan interaksi antara senyawa dengan reseptor, sehingga dapat diprediksi aktivitas senyawa. Aktivitas tersebut ditunjukkan dengan nilai energi ikatan yaitu nilai *Rerank Score* (RS), melalui program komputer *Mollegro Virtual Docker 5.5* (MVD). Nilai RS menunjukkan energi ikatan ligan dengan reseptor, semakin rendah nilai RS maka energi ikatan juga rendah, yang berarti kestabilan ikatan ligan dan

reseptor makin tinggi, dan dapat diprediksikan aktivitasnya juga semakin besar (Pangaribowo, 2013).

Pada penelitian pendahuluan dilakukan uji *in silico* senyawa terhadap masing-masing reseptor sesuai dengan mekanisme kerja senyawa RIF dan senyawa turunan (-)-epikatekin. Uji *in silico* RIF terhadap reseptor RNA *polymerase* (RNAP) yang dapat diunduh dari *protein data bank* (PDB), dipilih reseptor RNAP dengan kode 1I6V karena reseptor dengan kode 1I6V yang menyebutkan mekanisme rifampisin dalam menghambat enzim RNAP pada bakteri. Berdasarkan hasil uji *docking* menggunakan program MVD, didapatkan nilai RS RIF -117,2420.

Uji *in silico* senyawa turunan (-)-epikatekin terhadap reseptor *Fatty Acid Synthase* (FAS) yang dapat diunduh dari PDB, dipilih reseptor FAS dengan kode 2VB7 karena mekanisme senyawa turunan (-)-epikatekin yaitu merubah permeabilitas membran sel bakteri dengan cara menghambat sintesis asam lemak FAS. Berdasarkan hasil uji *docking* menggunakan program MVD, didapatkan nilai RS EC -92,994; RS ECG -135,21; RS EGC -95,458; dan RS EGCG -125,695, sehingga diprediksi bahwa senyawa turunan (-)-epikatekin memiliki aktivitas anti-tuberkulosis dan mampu menghambat sintesis asam lemak *fatty acid synthase* (FAS) pada *M. tuberculosis*.

Hubungan struktur-aktivitas anti-tuberkulosis senyawa turunan (-)-Epikatekin dari teh hijau yaitu EGC, ECG, dan EGCG yang dikombinasikan dengan RIF melalui parameter lipofilik, elektronik dan sterik terhadap bakteri *M. tuberculosis* ATCC H37RV dapat dinyatakan melalui persamaan statistik, yaitu persamaan regresi linier dan non linier.

Berdasarkan latar belakang di atas, akan dilakukan penelitian untuk mendapatkan pengobatan TB yang efektif dengan tujuan untuk melihat efek kombinasi EC, EGC, ECG, dan EGCG dengan RIF dalam menghambat atau membunuh bakteri *M. tuberculosis* ATCC H37RV. Aktivitas dinyatakan dengan kemampuan menurunkan nilai MIC dari RIF, sehingga diharapkan dapat memperpendek masa pengobatan TB dengan dosis yang lebih kecil, memperkecil efek samping, sehingga pengobatan anti-tuberkulosis dengan menggunakan RIF bisa lebih efektif. Selanjutnya dilihat hubungan kuantitatif struktur-aktivitas anti-tuberkulosis senyawa EC, ECG, EGC dan EGCG melalui parameter lipofilik (Clog P), elektronik (Etot) dan sterik (CMR), untuk mengetahui peran sifat lipofilik, elektronik dan sterik terhadap aktivitas anti-tuberkulosis senyawa turunan (-)-epikatekin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana prediksi aktivitas anti-tuberkulosis rifampisin dan senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-epigalokatekin galat secara *in silico* terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV ?
2. Apakah kombinasi senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-epigalokatekin galat dengan rifampisin memiliki aktivitas sebagai anti-tuberkulosis dalam menurunkan nilai MIC rifampisin terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV ?
3. Bagaimana hubungan kuantitatif struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, sterik, dan elektronik) senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-

epigalokatekin galat terhadap aktivitas anti-tuberkulosis terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui prediksi aktivitas anti-tuberkulosis rifampisin dan senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-epigalokatekin galat secara *in silico* terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV.
2. Mengetahui pengaruh senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-epigalokatekin galat terhadap rifampisin sebagai anti-tuberkulosis dalam menurunkan nilai MIC rifampisin terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV.
3. Menentukan hubungan kuantitatif struktur, sifat fisika kimia (lipofolik, sterik, dan elektronik) senyawa (-)-epikatekin, (-)-epikatekin galat, (-)-epigalokatekin dan (-)-epigalokatekin galat terhadap aktivitas anti-tuberkulosis terhadap *M. tuberculosis* ATCC H37RV.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan data bahwa komponen teh hijau EC, EGC, ECG, dan EGCG mampu bersinergi dengan rifampisin dalam menghambat bakteri *M. tuberculosis*, sehingga diharapkan nantinya dapat digunakan untuk terapi TB yang lebih efektif dengan dosis yang lebih kecil dan waktu pengobatan yang lebih pendek.

2. Informasi yang berguna mengenai pengaruh sifat kimia fisika terhadap aktivitas senyawa turunan epikatekin untuk pengembangan lebih lanjut senyawa turunan (-)-epikatekin.

