

**SINTESIS SENYAWA *N'*-(3,5-DINITROBENZOYL)-ISONICOTINOHYDRAZIDE
DAN STUDI INTERAKSINYA PADA *Mycobacterium tuberculosis*
ENOYL ACYL CARRIER PROTEIN REDUCTASE (INHA)**

Ruswanto¹, Aimi Ratnasari¹, Lilis Tuslinah¹

Prodi S-1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada Tasikmalaya
Email : ruzhone@gmail.com

ABSTRAK

Senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide disintesis melalui reaksi asilasi antara isoniazid dengan 3,5-dinitrobenzoyl klorida dalam pelarut tetrahidrofuran dengan cara refluks selama 8 jam. Persentase hasil senyawa sintesis yang diperoleh adalah 11,88%. Kemurnian hasil sintesis telah diuji dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan beberapa eluen yang berbeda menghasilkan noda tunggal dengan nilai Rf yang berbeda dari isoniazid dan 3,5-dinitrobenzoyl klorida dan uji jarak lebur menunjukkan rentang yang sempit. Identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan metode secara spektroskopi yaitu spektrofotometri UV – VIS, IR dan MS menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide sesuai dengan hipotesis. Studi interaksi secara *In Silico* dilakukan menggunakan software ArgusLab yang menunjukkan energi ikatan senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide lebih baik daripada isoniazid dengan parameter nilai *binding affinity* lebih kecil daripada senyawa isoniazid, nilai *binding affinity* terbaik senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide adalah -8,466699 kcal/mol pada reseptor tuberkulosis dengan kode PDB 2X23. Hasilnya divisualisasi menggunakan bantuan software Molegro Molecular Viewer (MMV) menunjukkan bahwa senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dapat berinteraksi dengan residu asam amino melalui interaksi ikatan hidrogen. Analisis *Drugs Scan* menunjukkan bahwa senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide memenuhi syarat sebagai obat dengan mengikuti aturan *Lipinski's rule of five* serta di uji toksisitasnya menggunakan ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*) dan hasilnya menunjukkan bahwa senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide memiliki nilai LC₅₀ dan EC₅₀ >100 mg/L sehingga termasuk dalam kategori rendah karena >100mg/L.

Kata Kunci: Modifikasi, Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide compound is synthesized through the acylation reaction between isoniazid with 3,5-dinitrobenzoyl chloride in tetrahydrofuran solvent by 8-hours reflux. The result's percentage of the compound synthesis which is obtained is 11,88%. The purity of the synthesis result is tested with thin layer chromatography (TLC) using several different eluents which produce a single mark with different Rf from isoniazid, 3,5-dinitrobenzoyl chloride and the melting point test show's a tight span. The identification of the structure is maintained by using spectroscopy method. The spectroscopy includes spectrophotometry UV-VIS, IR, dan MS reveals that the compound of the synthesis' result is *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide. This result is the same with the hypothesis. The study of the interaction through in silico is constructed by using software ArgusLab which shows the bonding compound's energy *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide is better than isoniazid with binding affinity parameter value is smaller than isoniazid compound. The best value of binding affinity from the *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide compound is -8,466699 Kcal/mol in the PDB code 2X23 tuberculosis receptor. The result is visualized by using software Molegro Molecular Viewer (MMV) support. It shows that the *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide compound could interact with amino acid residue through the interaction of hydrogen bonding. The analysis of the *Drugs Scan* reveals that the *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide compound complies the requirement as a drug with follow the *Lipinski's rule of five* and also follow the toxicity test by using ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*). To sum up, the result reveals that the *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide compound has LC₅₀ value and EC₅₀ >100 mg/L hence it is include in low category because it has 100mg/L.

Keywords: Modification, Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis atau TBC merupakan suatu jenis penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Ryana Ayu, 2012). Penyakit TBC tersebar diseluruh dunia dengan sepertiganya telah terinfeksi, disamping banyak kasus baru (insidensi) sekitar 8 juta pertahun dengan angka kematian meningkat 2 – 3 juta manusia pertahun. Dilaporkan bahwa diseluruh dunia setiap 18 detik ada seseorang yang meninggal akibat penyakit ini (Tjay, 2007). Menurut Departemen Kesehatan, kini penanggulangan TB di Indonesia menjadi lebih baik, data statistik *World Health Organization* (WHO) menunjukkan Indonesia turun dari peringkat tiga menjadi peringkat ke lima dunia dengan jumlah insiden terbanyak TB pada tahun 2009 setelah India, China, Afrika Selatan, dan Nigeria. Beberapa hasil dan pencapaian program TB, menurut Tjandra Yoga angka keberhasilan pengobatan TB di Indonesia naik sebesar 91% pada tahun 2008. Target pencapaian angka penemuan kasus TB Paru *Case Detection Rate* (CDR) tahun 2009 sudah mencapai 73,1%. Insiden TB Paru sejak tahun 1998 sampai tahun 2005 trennya menurun dan rata-rata penurunan insiden TB Paru positif tahun 2005-2007 adalah 2,4% (Bertin, 2011).

Pengobatan dalam tuberkulosis banyak jenisnya, salah satunya adalah Isoniazid. Isoniazid atau isonikotinil hidrazid yang sering disingkat dengan INH ini merupakan derivat dari asam nikotinat yang berkhasiat paling kuat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada fase istirahat dan bersifat bakterisid terhadap bakteri yang sedang tumbuh pesat (Tjay, 2007). Isoniazid memiliki mekanisme kerja menghambat biosintesis asam mikolat (mycolic acid) yang merupakan unsur penting dinding sel mikobakterium (Sulistia G. 2000). Isoniazid dapat menyebabkan neuritis perifer karena bekerja sebagai antagonis terhadap piridoksin (vitamin B6) dan meningkatkan ekskresi piridoksin melalui ginjal (Siswandono, 2008).

Untuk meminimalisir efek samping dan mencegah resistensi terhadap INH banyak peneliti yang melakukan

modifikasi molekul atau membuat derivatnya diantaranya Elham dkk (2015), telah berhasil membuat senyawa turunan dari isoniazid yakni senyawa *N'-(3-ethoxy-2-hydroxybenzilidene)-isonicotinohydrazide*. Sebagai hasil reaksi antara isoniazid dengan 3-ethoxysalicylaldehyde. Senyawa hasil sintesis tersebut telah diuji secara in vitro dan menunjukkan daya hambat minimumnya adalah sebesar 4 μ g/ml.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka akan dilakukan pengembangan obat antituberkulosa dengan cara modifikasi molekul obat, yakni sintesis dan studi interaksi senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* terhadap bakteri TBC pada reseptor Enoyl-Acyl carrier Protein Reductase. Senyawa tersebut dapat disintesis dari 3,5-dinitrobenzoil klorida yang direaksikan dengan isoniazid melalui mekanisme reaksi asilasi. Kemudian, senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* yang diperoleh dilakukan karakterisasi (jarak lebur, KLT, UV-VIS, IR, dan MS) selanjutnya diuji interaksi senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* terhadap bakteri TBC pada reseptor Enoyl-Acyl carrier Protein Reductase (INHA) dengan metoda *docking*.

ALAT DAN BAHAN

Alat

Alat yang digunakan terdiri dari peralatan untuk penelitian di laboratorium dan studi *in silico*. Peralatan untuk sintesis diantaranya alat-alat gelas yang digunakan di laboratorium, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator*, *hot plate*, corong *buchner*, lampu UV 254 nm, *chamber*, *oven*, kertas saring, timbangan analitik, *Electrothermal Melting Point* 9100, Spektrofotometer UV-Visibel GENESYS, Spektrometer Massa, Spektrometer Infra merah (IM). Sedangkan peralatan yang digunakan untuk studi *in silico* diantaranya komputer adalah System Model: SatelliteC800D, BIOS: Insyde VersionCCB. 03.72.066.40, Processor: AMD E1-1200 APU with Radeon(tm) HD Graphics (2 CPUs), ~1.4GHz Memory: 2048MB RAM, Available OS Memory: 1642MB

RAM. *software* yang digunakan adalah *Marvin Sketch 5.2., ArgusLab 4.0.1, MMV (Molegro Molecular Viewer), dan ECOSAR.*

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari bahan-bahan untuk penelitian di laboratorium dan studi *in silico*. Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian di laboratorium diantaranya isoniazid p.a, 3,5-dinitrobenzoyl klorida p.a, tetrahidrofuran p.a, trietilamin p.a, etanol p.a, natrium bikarbonat p.a, aseton p.a, aquabidestillata, metanol p.a, kloroform p.a, etil asetat p.a, DMSO (dimetil sulfoksida) p.a, Silika gel 60 GF₂₅₄. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk studi *in silico* diantaranya reseptor tuberkulosis yang didownload dari *Protein Data Bank (PDB)* yang dikeluarkan oleh *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RSCB)* dengan alamat web <http://www.rscb.org/pdb/> dan struktur senyawa *N'-(3,5 dinitrobenzoyl klorida)-Isonicotinohidrazide*.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian terdiri dari proses sintesis senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohidrazide* dan proses docking senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohidrazide* pada reseptor tuberkulosis yaitu INHA menggunakan metode komputasi.

Sintesis Senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohidrazide*

Isoniazid ditimbang sebanyak 1,3714gram (BM:137,14 g/mol; 0,01 mol) dimasukkan kedalam labu alas datar kering lalu ditambah 25 mL tetrahidrofuran dan \pm 3 mL trietilamin sampai pH 10. Kemudian pada corong pisah kering dimasukkan 1,8448gram (BM:230,56g/mol; 0,008 mol) 3,5-dinitrobenzoyl klorida dan 20 mL tetrahidrofuran dikocok secara perlahan sampai larut. Setelah itu, 3,5-dinitrobenzoyl klorida yang berada dalam corong pisah diteteskan sedikit demi sedikit kedalam labu alas datar sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*

pada suhu kamar. Kemudian campuran direfluks pada suhu \pm 195°C. Setiap jam campuran dipantau menggunakan KLT dengan fase gerak metanol:klorofom (2:1). Refluks dihentikan ketika diperoleh noda 1 spot dan terjadi perbedaan nilai Rf dari senyawa pembanding pada plat KLT. Hasil refluks diupkan menggunakan *rotary evaporator*, ditambahkan NaHCO₃ jenuh, kemudian dicuci dengan aquades secukupnya selanjutnya difiltrasi menggunakan corong buchner (Suzzana, 2010).

Rekristalisasi Senyawa Hasil Sintesis

Etanol sebanyak 100 ml dimasukan ke dalam gelas kimia 250 ml kemudian dipanaskan pada *hot plate*. Setelah panas senyawa hasil sintesis dimasukan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga senyawa larut semua ke dalam gelas kimia berisi etanol. Larutan yang diperoleh didiamkan pada suhu kamar sampai terbentuk kristal. Setelah itu kristal yang terbentuk disaring dengan corong *buchner* lalu dipindahkan ke cawan uap dan dioven pada suhu 60°C selama 30-60 menit kemudian kristal ditimbang (Suzzana, 2010).

Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis

Uji kemurnian pada penelitian ini diantaranya menggunakan KLT dan penentuan jarak lebur.

Analisis dengan KLT

Setelah diperoleh kristal kemudian diuji kemurnian dengan KLT menggunakan fase gerak metanol : klorofom 2 : 1, metanol : etil asetat 9 : 1, metanol : etil asetat 3 : 1 dan etanol : klorofom 3 : 1, etanol : klorofom 1:9, klorofom: aseton: etanol 11:3:1, sedangkan fase diamnya digunakan silika gel 60 GF₂₅₄. Senyawa dielusi, kemudian dikeringkan lalu dilihat pada lampu UV 254 nm dan dihitung nilai Rf senyawa hasil sintesisnya kemudian dibandingkan dengan Rf pembanding yaitu Rf isoniazid.

Penentuan Jarak Labur

Menggunakan alat *Electrothermal Melting Point*, sedikit senyawa hasil dimasukkan ke dalam pipa kapiler dengan salah satu ujungnya tertutup sampai terisi ± 2 mm. Diamati suhunya pada saat senyawa tersebut mulai melebur sampai seluruh senyawa tersebut melebur (Silverstein, 1998).

Identifikasi dan Karakterisasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

Identifikasi dan karakteristik senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visibel, Spektrometer Inframerah dan Spektrometer Massa untuk mengetahui struktur senyawa hasil sintesis (Silverstein, 1998).

Docking Senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* pada Reseptor Tuberkulosis

Senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* di-docking-kan pada reseptor tuberkulosis dengan menggunakan *ArgusDock* melalui beberapa tahapan. Proses docking dilakukan menggunakan software *ArgusLab*.

Preparasi Ligan

Ligan digambar dengan menggunakan *software marvin sketch 5.2* lalu dioptimasi geometri, dengan diprotonasi pada pH 7,4 agar pH ny sesuai dengan pH dalam darah. Kemudian dilakukan Conformation search ini untuk memperoleh posisi molekul yang paling stabil untuk berinteraksi dengan sisi aktif reseptor. Kemudian disimpan dalam bentuk mrv dan mol2 untuk proses *docking*.

Validasi Metode Docking

Program *ArgusLab* divalidasi untuk mendapat metode yang dapat dipercaya. Reseptor yang digunakan adalah reseptor tuberkulosis (INHA) yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB). Protein reseptor yang telah didownload ini

kemudian dipilih ligan alaminya untuk proses validasi metode *docking*. Parameter yang diperoleh apabila metodenya valid adalah *RMSD position between two simlliar groups*. Metode *docking* dikatakan baik jika nilai RMSD yang dihasilkan lebih kecil atau sama dengan 2Å. Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari 2Å maka metode yang digunakan tidak dapat dipercaya (*ArgusLab*, 2004).

Docking senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* pada reseptor tuberkulosis

Pada proses *docking* menggunakan software *ArgusLab*, masukkan protein target atau reseptor kemudian pilih ligan alami yang digunakan untuk proses validasi, selanjutnya diatur gridboxnya sesuai dengan yang telah dipakai untuk proses validasi. Hasil yang diperoleh dari proses *docking* ini adalah berupa *energy best ligand pose* atau berupa *binding affinity* senyawa/ligan. Selanjutnya dari proses *docking* dapat dilihat interaksi antara ligan dengan sisi aktif reseptor menggunakan software MMV (*Molegro Molecular Viewer*).

Analisis Hasil Docking

Hasil *docking* reseptor dengan ligan kemudian diubah dalam bentuk *pdb* lalu dianalisis menggunakan *software Molegro Molecular Viewer* (MMV) dengan dilihat interaksinya dalam bentuk 2 Dimensi dan 3 Dimensi (Wardani, 2012).

Screening Ligan Based Drugs Likeness (Drugs scan)

Pengamatan obat dilakukan dengan memperhatikan *the rule of good medicine (Lipinski's rule of five)* dan bioavaibilitas oral dari ligan. Parameter yang digunakan yaitu berat molekul <500 g/mol, lipopilitas <5, donor ikatan hidrogen <5, aseptor ikatan hidrogen <10, dan *refractory* molar antara 40-130 (Lipinski, 2001). Parameter tersebut dapat dilihat dengan bantuan program *MarvinSketch 5.2*.

Uji Toksisitas Menggunakan ECOSAR

Data yang diperlukan pada uji toksisitas menggunakan program ECOSAR adalah deskripsi dari struktur senyawa kimia. Hal ini bisa dimasukkan dalam sistem dengan menggunakan notasi *Simplified Molecular Input Line Entry System* (SMILES), nomor registrasi CAS atau nama jika tersedia dalam *data base*, menggambar yang baru program dalam ECOSAR, *file* dalam bentuk *.mol* untuk memasukkan senyawa kimia tunggal atau *file .sdf* atau deretan *file* untuk menampilkan *batch runs*. Data yang selanjutnya adalah koefisien partisi oktanol/ air (Log P). Dengan informasi tersebut, ECOSAR bisa menampilkan analisis hubungan struktur aktivitas dan perkiraan secara otomatis nilai toksisitas standar untuk zat aktif.

(<http://www.epa.gov/oppt/newchems/tools/21ecosar.htm>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil sintesis selama 8 jam senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* diperoleh sebanyak 0,3147gram dengan presentase hasil yang didapat adalah 11,88%. Senyawa hasil sintesis berupa serbuk amorf berwarna merah bata tidak berbau, tidak larut air, larut dalam etanol panas.

Uji Kemurnian

Uji kemurnian senyawa hasil sintesis dilakukan dengan uji KLT menggunakan beberapa eluen yang berbeda polaritasnya. Dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kemurnian

Eluen	Nilai Rf		
	3,5-dinitrobenzoyl klorida	isoniazid	Senyawa hasil sintesis
Metanol: klorofom (2;1)	0,74	0,63	0,68
Metanol: Etil Asetat (9:1)	0,66	0,68	0,86
Metanol: etil asetat (3:1)	0,68	0,6	0,86
Etanol: klorofom (3:1)	0,71	0,63	0,9
Etanol: klorofom (1:9)	0,35	0,27	0,53
Klorofom: aseton: etanol (11:3:1)	0,49	0,57	0,66

Dari beberapa eluen yang berbeda dengan polaritas yang berbeda pula diperoleh nilai Rf dari senyawa hasil sintesis yang berbeda dari isoniazid dengan 3,5-dinitrobenzoyl klorida dan noda yang diperoleh pun tunggal.

Uji jarak lebur menggunakan alat *electrothermal* 9100. Berdasarkan hasil pengujian jarak lebur senyawa hasil sintesis diperoleh hasil 222-224°C dan dapat diprediksi senyawa telah murni karena rentangnya <2°C. Semakin lebar jarak leburnya menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa campuran, sehingga dibutuhkan rentang yang lebih besar untuk melebur.

Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometer UV-VIS, Inframerah dan Massa

Dari spektrum senyawa hasil sintesis diperoleh panjang gelombang maksimum 359nm. Pergeserannya tidak terlalu besar hal ini dikarenakan pada struktur senyawa hasil sintesis yakni senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide* terdapat gugus penarik elektron (yaitu gugus nitro) dan gugus pemberi elektron satu terhadap yang lainnya ada pada posisi meta, sehingga spektrum hanya berbeda sedikit saja dari spektrum senyawa yang memiliki gugus yang bersangkutan (Creswell, 2005). Meskipun pergeserannya hanya sedikit saja, namun pergeserannya menuju ke pergeseran yang lebih besar (pergeseran merah). Panjang gelombang maksimum senyawa hasil sintesis ini berbeda dengan isoniazid yaitu 263nm. Perbedaan panjang gelombang ini terjadi karena pada senyawa

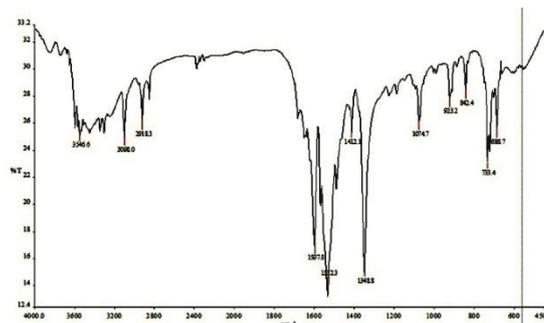
N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide terdapat penambahan gugus kromofor berupa cincin aromatis yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga menyebabkan energi elektron untuk tereksitasi makin rendah dan serapannya terjadi pada panjang gelombang yang lebih besar.

Untuk membantu mengetahui terbentuknya senyawa baru dari proses

sintesis dapat digunakan data spektrum inframerah untuk mengetahui gugus – gugus fungsi yang terdapat pada senyawa hasil sintesis. Berdasarkan hasil pemeriksaan menggunakan spektrometri inframerah diperoleh hasil spektrum yang merupakan gugus fungsi penyusun senyawa hasil sintesis berupa bilangan gelombang (cm^{-1}). Hasilnya dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 3.

Tabel 2. Bilangan Gelombang Spektrum Inframerah Senyawa Hasil Sintesis

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang Hasil Sintesis (cm^{-1})
N-H <i>Stretch</i> (ulur)	3546,6
C=O <i>Stretch</i> (ulur)	1597,8
-C=CH <i>Bending</i> (Tekuk)	3098,0 dan 2918,3
N=O <i>Stretch</i> (ulur)	1532,3
N=O <i>Bending</i> (tekuk)	1348,8



Gambar 3. Spektrum Inframerah Senyawa Hasil Sintesis

Gugus fungsi yang teridentifikasi diantaranya gugus N-H pada puncak spektrum didaerah $3546,6 \text{ cm}^{-1}$. Gugus N – H mampu membentuk suatu ikatan hidrogen sehingga bilangan gelombangnya tinggi dan serapannya lebih tinggi. Gugus fungsi C=O mengabsorpsi serapan pada daerah bilangan gelombang $1597, 8 \text{ cm}^{-1}$. Penyerapan didaerah bilangan gelombang (cm^{-1}) ini terjadi karena pada gugus C=O elektronegatifitas O tinggi sehingga cenderung untuk membentuk ikatan hidrogen menyebabkan pergeseran frekuensi lebih rendah. Pada gugus -C=CH mengabsorpsi serapan pada $3098, 0$ dan $2918,3 \text{ cm}^{-1}$, gugus -C=CH ini merupakan salah satu ciri dari senyawa aromatis. Dan gugus NO_2 ini memiliki vibrasi regang N=O asimetris dan simetris berupa pita kuat pada daerah $1532,3 \text{ cm}^{-1}$ dan pita kuat didaerah $1348,8 \text{ cm}^{-1}$ dalam

daerah sidik jari. Gugus ini dapat sangat mudah terlihat sebagai puncak – puncak terkuat dalam senyawa ini.

Selain itu, untuk memperkuat dugaan bahwa senyawa hasil sintesis telah terbentuk, dilakukan identifikasi struktur dengan menggunakan spektrometri massa untuk mengetahui berat molekul sesungguhnya. Hasilnya dapat dilihat pada



Gambar 4. Hasil spektrum massa Senyawa Hasil Sintesis

Berdasarkan hasil spektrum massa terlihat puncak tertinggi ion molekul dari BM senyawa Hasil Sintesis. Dengan demikian terbukti bahwa senyawa hasil sintesis telah terbentuk dari proses sintesis jika dilihat dari beberapa hasil identifikasi.

Docking Senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide Pada Reseptor Tuberkulosis

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *ArgusDock* antara senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dengan reseptor tuberkulosis (Enoyl acyl carrier protein reductase) dengan kode 2X23.

Preparasi Ligan

Ligan *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide yang digunakan pada proses *docking* dioptimasi geometri dan pH nya disesuaikan dengan pH dalam darah yaitu 7,4.

Validasi Metode *Docking*

Validasi ini dilakukan dengan kondisi tanpa air pada reseptor, karena keberadaan air dapat mempengaruhi interaksi ikatan ligan/obat-reseptor. validasi dilakukan pula agar metode yang dipakai untuk mendocking senyawa hasil sintesis dapat dipercaya sebagai referensi dalam *docking*. Adapun parameter yang digunakan dalam proses validasi metode *docking* ini adalah berupa nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Dikatakan valid, apabila RMSD yang diperoleh adalah <2. Adapun RMSD yang diperoleh pada saat validasi metode *docking* adalah 1,287188 Å.

Docking Menggunakan *ArgusDock*

Docking senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dengan reseptor tuberkulosis

menggunakan software *ArgusLab* dilakukan juga untuk isoniazid sebagai pembanding pada proses *docking* digunakan pengaturan grid box yang sudah divalidasi sebelumnya.

Analisis Hasil *Docking*

Berdasarkan hasil *docking* ligan alami, isoniazid dan senyawa hasil sintesis diperoleh konformasi ligan dengan energi terkecil. *Binding affinity* merupakan ukuran kemampuan obat untuk berikatan pada reseptor. Semakin kecil nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi begitu pula sebaliknya semakin besar nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin rendah. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Grid box, RMSD, Nilai *Binding Affinity*

Kode PDB	RMSD (Å)	Binding Affinity (kcal/mol)		
		Ligan alami	isoniazid	Senyawa Hasil Sintesis
2X23	1,287188	-12,992	-7,1324	-8,466699

Dari data tabel 5 dapat dilihat bahwa nilai *binding affinity* berturut – turut dari ligan alami, isoniazid dan senyawa hasil sintesis -12,992, -7,1324, dan -8,466699 kcal/mol lebih rendah daripada isoniazid yang berarti interaksinya lebih baik dan stabil dibanding isoniazid. Tapi jika dibandingkan dengan ligan alami senyawa hasil sintesis dan isoniazid memiliki afinitas yang lebih besar (-12,992 kcal/mol).

Visualisasi Hasil *Docking*

Visualisasi hasil *docking* dilakukan untuk mengetahui interaksi antara ligan dengan residu asam amino dari reseptor tuberkulosis. Adapun interaksi ligan dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Data Jenis Gugus Senyawa yang Berikatan Melalui Ikatan Hidrogen

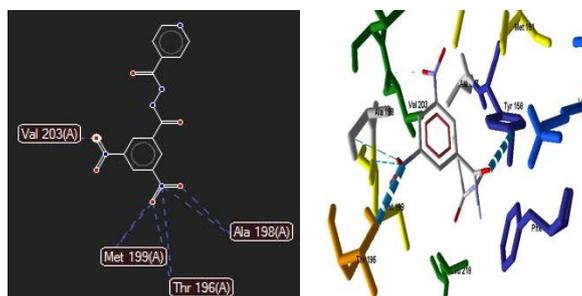
Senyawa	Ikatan Hidrogen	Jarak Ikatan (Å)	Energi (kcal/mol)	Gugus Senyawa yang berikatan
Ligan alami	Tyr 158	2,4453	-1,21083	OH
Isoniazid	Pro 156	2,4399	-1,16655	NH ₂

Senyawa Hasil Sintesis	Ala 198	3,33916	-0,0216431	NO ₂
	Ala 198	3,06513	-0,207936	NO ₂
	Thr 196	2,74039	-2,5	NO ₂
	Met 199	2,81528	-0,362743	NO ₂
	Val 203	2,99904	-0,0393928	NO ₂
	Tyr 158	2,6085	-2,35596	C=O

Dapat dilihat terdapat interaksi antara senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide dengan residu – residu asam amino melalui ikatan hidrogen.

Ikatan hidrogen pada senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide berinteraksi dengan 5 asam amino dengan jarak antar atom dan energi yang berbeda pula. Kebanyakan gugus pada senyawa *N'*-(3,5-

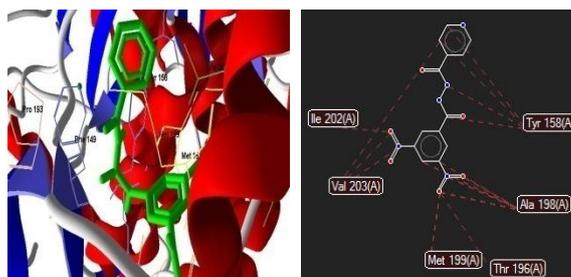
dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide yang berinteraksi dengan reseptor tuberkulosis adalah atom O dan N dari gugus NO₂, C=O yang terikat pada cincin aromatis. Interaksi senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide dengan reseptor tuberkulosis dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Interaksi Senyawa dengan Asam Amino

Selain interaksi melalui ikatan hidrogen, dilihat juga interaksi lainnya dengan residu – residu asam amino (gambar 8). Semakin banyak interaksi antara senyawa

N'-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide dengan residu asam amino maka diprediksi interaksinya semakin baik.



Gambar 8. Visualisasi 3D dan 2D Senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide

Berdasarkan gambar diatas senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide berinteraksi dengan residu asam amino sebanyak 7 sedangkan isoniazid berinteraksi dengan 2 residu asam amino. Dari gambar ini dapat diprediksi bahwa interaksi senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide lebih baik dibanding isoniazid.

Screening Ligand Based Drug Likeness (Drugs scan)

Drug-Likeness mengacu pada kemiripan suatu senyawa dengan obat oral. Adapun metode untuk mengevaluasi *drug-likeness* ini yaitu menggunakan aturan *Lipinski's Rule of Five* (Lipinski). Data penerapan aturan Lipinski dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil *Drugs scan* menurut Aturan *Lipinski*

No.	Parameter	Ketentuan	Hasil
1.	Berat Molekul	331,553 g/mol	<500 g/mol
2.	<i>Log p</i>	0,75	<5
3.	<i>Refractory Molar</i>	81,17	40-130
4.	Donor Proton	2	<5
5.	Akseptor proton	7	<10

Berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan, diperoleh hasil *drugs scan* senyawa *N'-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide* memenuhi syarat dari aturan *Lipinski's rule of five*.

Nilai berat molekul berhubungan dengan proses distribusi obat. Proses distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi. Obat dengan berat molekul >500 g/mol berarti memiliki ukuran yang besar sehingga akan sulit untuk menembus membran biologis dan waktu absorpsi obat akan membutuhkan waktu yang lama. Beda halnya dengan obat atau senyawa yang memiliki berat molekul lebih kecil akan memiliki ukuran molekul yang kecil sehingga akan memudahkan obat untuk menembus membran biologis.

Nilai log P berhubungan dengan hidrofobisitas atau lipofilisitas yakni kemampuan suatu senyawa untuk dapat larut dalam lemak, minyak, dan pelarut non polar. Jika nilai log P > 5 maka suatu senyawa akan lebih lama tinggal di *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektivitas ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang dan menyebabkan toksisitasnya menjadi lebih tinggi. Hidrofobisitas juga berperan dalam menentukan kemana obat akan didistribusikan didalam tubuh setelah absorpsi dan seberapa cepat obat akan mengalami metabolisme dan diekskresikan oleh tubuh.

Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berkaitan dengan aktivitas biologis dari suatu molekul obat. Ikatan hidrogen dapat mempengaruhi sifat kimia-fisika, seperti titik didih, titik lebur, kelarutan dalam air, kemampuan dalam

pembentukan kelat dan keasaman. Perubahan sifat – sifat tersebut dapat berpengaruh terhadap aktivitas biologis. *Refractory molar* adalah suatu nilai total polarisabilitas dari molekul obat yang sangat bergantung pada suhu, indeks bias dan tekanan (Widiyanti, 2013).

Uji Toksisitas Menggunakan Program ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationship*)

Uji toksisitas menggunakan ECOSAR ini digunakan untuk mengetahui toksisitas senyawa terhadap organisme yang ada dalam air. Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis memiliki nilai Log P lebih rendah dibanding isoniazid, hal ini membuktikan semakin kecil Log P semakin rendah pula toksisitasnya terhadap organisme dalam air. Toksisitas senyawa hasil sintesis ini termasuk kategori toksisitas rendah karena dilihat dari nilai LC₅₀ dan EC₅₀>100 mg/ L .(<http://www.epa.gov/oppt/sf/pubs/ecosar.pdf>). Hal ini dikarenakan ketika suatu senyawa memiliki energi ikatan yang rendah maka ikatan antara reseptor dengan senyawa tersebut semakin kuat, sehingga senyawa tersebut lebih lama tinggal pada membran biologis dan menyebabkan toksik (ECOSAR, 2012). Hal ini dikarenakan ketika suatu senyawa memiliki energi ikatan yang rendah maka ikatan antara reseptor dengan senyawa akan semakin kuat sehingga menyebabkan senyawa ini lebih lama tinggal pada membran biologis dan menyebabkan timbulnya efek toksik. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Uji Toksisitas Menggunakan Program ECOSAR

Senyawa	MW (g/mol)	Water Solubility (mg/L)	Log Kow	Neutral organic SAR (Baseline Toxicity) (mg/L)		
				<i>Fish</i> LC ₅₀ , 96 h	<i>Daphnid</i> LC ₅₀ , 48 h	<i>Green Algae</i> EC ₅₀ , 96 h
Isoniazid	134,18	9839	1,117	684,411	306,237	282,586
Senyawa <i>N'</i> -(3,5- dinitrobenzoyl)- isonicotinohydrazide	331,25	885,9	0,664	4308,668	1769,218	1628,329

MW: Molecular Weight, SAR : Structure Activity Relationship, Kow : Octanol-water partition coefficient

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide diperoleh dari hasil sintesis antara isoniazid dengan 3,5-dinitrobenzoyl klorida melalui reaksi asilasi menggunakan refluks selama 8 jam dengan modifikasi pelarut pada metode *Schotten Baumann* sehingga diperoleh senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dengan % Rendemen sebanyak 11,88 %. Konfirmasi terbentuknya senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide telah dibuktikan dengan proses uji kemurnian dan identifikasi struktur senyawa.

Dari hasil studi *In Silico* menggunakan metode docking dengan *ArgusLab* diketahui terjadi interaksi antara senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dengan reseptor INHA kode PDB 2X23 yang memiliki nilai *Binding Affinity* sebesar -8,466699 Kcal/mol. Dari hasil docking dapat disimpulkan bahwa senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide lebih baik daripada senyawa induknya yaitu isoniazid dengan parameter nilai *Binding Affinity* isoniazid lebih besar daripada senyawa *N'*-(3,5-dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazide.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan untuk melakukan penelitian mengenai uji secara *in vitro* senyawa hasil sintesis pada bakteri tuberkulosis, uji Farmakologi untuk mengetahui mekanisme kerjanya serta dipelajari profil Farmakokinetiknya, pengembangan sediaan berupa

pendalaman formula yang cocok untuk senyawa hasil sintesis, uji toksisitas terhadap hewan percobaan untuk mengetahui keamanan senyawa dan respon tubuh yang ditimbulkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayu, Ryana S.K., Faktor Risiko Kejadian Tuberkulosis Paru di Kecamatan Baturetno Kabupaten Wonogiri. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, Vol. 11 No.2. 2012. Universitas Diponegoro.
- Creswell, Clifford J, Olaf A. Runquist, Malcolm M Campbell. 2005. *Analisis Spektrum senyawa Organik*. Bandung : Penerbit ITB.
- Ganiswarna, Sulistia G. *Farmakologi dan Terapi Edisi 4*. 2000. Jakarta: UI Press.
- Siswandono, dan Bambang Soekardjo. *Kimia Medisinal Edisi 2 Jilid I dan Jilid II cetakan ke -2*. 2008. Surabaya: Airlangga University Press.
- Silverstein, Bassler dan Morrill. *Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik Edisi Empat*. Alih Bahasa Drs. A.J. Hartomo dan Dra. Anny Victor Purba M. Sc. 1986. Jakarta: Erlangga.
- Suzana, dan Tutuk Budiati. Pengaruh Gugus Nitro dengan posisi para (p) pada Sintesis *N'*-(4-Nitrobenzoyl)tiourea. *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol. 8 No.1. 2010. Hal. 15 – 19.

- Tirtana, Bertin Tanggap. Faktor – faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Pengobatan pada Pasien Tuberkulosis Paru dengan Resistensi Obat Tuberkulosis di Wilayah Jawa Tengah. 2011. [Artikel Ilmiah] hal. 1 – 19.
- Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja. *Obat- obat penting Khasiat Penggunaan dan Efek–* *Efek Sampingnya Edisi Enam.* 2007. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Widianti, Tri dkk. Docking dan Modifikasi Struktur Senyawa Baru Turunan Parasetamol. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi vol. 2 No. 1 Juni 2013.* Universitas Airlangga.
<http://www.epa.gov/oppt/newchems/tools/21ecosar.htm>