

SINTESIS DAN STUDI IN SILICO SENYAWA 3-NITRO-N'-[(PYRIDIN-4-YL) CARBONYL]BENZOHYDRAZIDE SEBAGAI KANDIDAT ANTITUBERKULOSIS

Ruswanto^{a*}, Mardhiaha^a, Richa Mardianingrum^a & Korry Novitriani^a

^aProdi Farmasi, STIKes Bakti Tunas Husada, Jl. Cilolohan No. 36 Tasikmalaya

*Alamat Korespondensi: Jl. Sukanaga Sindanggalih RT. 001 RW. 015 Kel. Kahuripan Kec. Tawang

Abstrak: *InhA* adalah *enoyl-acyl carrier protein reductase* didalam *Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan target yang menarik untuk pengembangan obat baru terhadap TBC, penyakit yang membunuh lebih dari dua juta orang setiap tahun. *InhA* adalah target utama obat isoniazid dalam pengobatan infeksi tuberkulosis. Pada penelitian ini telah disintesis turunan isoniazid yaitu senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide melalui reaksi asilasi antara 3-nitrobenzoyl klorida dengan isoniazid dengan menggunakan pelarut tetrahidrofuran. Persentase hasil sintesis adalah 59,11%. Kemurnian hasil sintesis ditunjukkan dengan adanya noda tunggal pada KLT (Komatografi lapis tipis) dan jarak lebur yang sempit. Berdasarkan hasil identifikasi Spektrofotometer UV, Spektrofotometer IR dan Spektrometer ¹H-NMR menunjukkan senyawa hasil sintesis 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide sesuai dengan yang diharapkan. Selain itu dalam penelitian ini juga dilakukan uji *in silico*: (1) Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan tiga parameter seperti *benigni*, *crammer rules* dan *kroes TTC*, (2) Interaksi senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide terhadap *InhA* yang menunjukkan bahwa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohidrazide memiliki interaksi dengan reseptor *enoyl-acyl carrier protein reductase* (*InhA*) lebih baik daripada isoniazid dengan nilai *binding affinity* 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide sebesar -9,17647 kkal/mol dan isoniazid -7,1034 kkal/mol.

Kata kunci: isoniazid, tuberkulosis, *InhA*, benzohidrazide

Abstract: *InhA*, the *enoyl-ACP reductase* in *Mycobacterium tuberculosis* is an attractive target for the development of novel drugs against tuberculosis, a disease that kills more than two million people each year. *InhA* is the target of the current first line drug isoniazid for the treatment of tuberculosis infections. The 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide compound has been synthesized by asilation reaction 3-nitrobenzoyl chloride with Isonicotinohidrazide using tetrahidrofuran solvent. The percentage outcome synthesis was 59,11%. The purity shown by single stain on TLC (Thin Layer Chromatography) and narrow melting distance. Based on the identification result of UV Spectrofotometer, Infrared Spectrofotometer and H-NMR Spectrometer, the synthesis result compound was sign similarity as expected. In addition, this study also tested *in silico*: (1) Toxicity test conducted using three parameters likes *benigni*, *crammer rullles* and *kroes TTC*, (2) The interaction study of 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohidrazide compound with *enoyl-acyl carrier protein reductase* (*InhA*) better than isoniazid with *binding affinity* value -9.17647 kcal / and -7.1034 kcal /mol for isoniazid.

Keywords: isoniazid, tuberculosis, *InhA*, benzohidrazide

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) menjadi penyakit yang sangat diperhitungkan saat meningkatnya angka kematian penduduk terutama di negara berkembang. Diperkirakan sepertiga populasi dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, organisme penyebab tuberkulosis (Somantri, 2007).

Secara nasional, pada tahun 2004 ada 539.000 kasus baru dan kematian 101 per 100.000 penduduk. Dari laporan *World Health Organization* (WHO) tahun 2005 dinyatakan bahwa estimasi insiden TB paru di Indonesia dengan dasar hasil pemeriksaan dahak bakteri tahan asam (BTA) positif adalah 128 per 100.000 penduduk. Sedangkan estimasi TB paru semua kasus adalah 675 per 100.000 penduduk untuk tahun 2003 dengan perkiraan prevalensi sebesar 295 per 100.000 penduduk (Widyanto dkk., 2013). Survei yang dilakukan WHO tahun 2007 menunjukkan adanya 92 juta kasus baru dan 1,8 juta jiwa

diantaranya meninggal dunia. Indonesia menduduki peringkat ketiga didunia setelah Cina dan India dalam jumlah kasus TB (Barker et al., 2009).

Banyaknya kasus baru dan kematian ini merupakan salah satu akibat dari terjadinya resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap isoniazid. Isoniazid merupakan suatu prodrug yang akan diaktivasi oleh KatG (Katalase-peroksidase). Isoniazid juga merupakan obat tuberkulosis yang paling penting saat ini. Penelitian mengenai resistensi kuman tersebut terhadap Isoniazid di Yogyakarta mencapai 16% (Rintiswati & Wijayanti, 1999). Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* memacu perkembangan penelitian obat antituberkulosis.

Beberapa penelitian terbaru telah mengembangkan senyawa-senyawa ester yang dapat digunakan dalam pengobatan TB yang menunjukkan bahwa senyawa ester yang disintesis memperlihatkan aktivitas antituberkulosis yang menarik dengan

konsentrasi daya hambat sekitar $\geq 90\%$ (Firdaus dkk., 2013). Telah disintesis beberapa derivat baru dari (*E*)-*N*-(*monosubstituted-benzylidene*) *isonicotino hydrazide*- dan *2-propoxybenzylideneisonicotino hydrazide*. Derivat dari (*E*)-*N*-(*monosubstituted-benzylidene*)*isonicotinohydrazide* secara signifikan mampu menghambat aktivitas *Mycobacterium tuberculosis* dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar $0,31 \mu\text{g/mL}$ (Lourenco et al., 2007). Malhotra, et al (2011) telah mensintesis dan mengevaluasi beberapa derivat baru dari *2-propoxybenzylideneisonicotinohydrazide* sebagai senyawa anti bakteri. Senyawa *2-propoxybenzylideneisonicotinohydrazide* merupakan hasil reaksi antara isoniazid dengan *2-propoxybenzaldehyde* menggunakan pelarut etanol. Kemudian, *2-propoxybenzylideneisonicotinohydrazide* dievaluasi menggunakan metode elemental dan spektral.

Pada penelitian telah berhasil direaksikan antara isoniazid dengan *3-nitrobenzoyl klorida* menghasilkan *3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide*. Penambahan gugus aromatik akan menambah sifat non polarinya sehingga akan meningkatkan sifat lipofilitasnya. Dengan meningkatnya sifat lipofilitas ini, maka diharapkan obat akan lebih mudah masuk ke dalam membran inti. Selain itu pada struktur tersebut terdapat gugus-gugus yang bersifat hidrofili. Gugus hidrofili ini berhubungan dengan kelarutan senyawa dalam cairan luar sel yang berhubungan dengan proses transpor obat ke tempat aksi atau reseptor.

Selain sintesis, penelitian ini juga bertujuan secara *in silico* untuk mempelajari interaksi senyawa *3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide* dengan reseptor InhA melalui metode *docking*, mempelajari prediksi toksisitas dengan *Toxtree* dan *drug scans* dari Lipinski.

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat yang digunakan untuk sintesis diantaranya peralatan gelas yang sederhana, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *rotary evaporator*, corong *buchner*, lampu UV 254 nm, *chamber*, *oven*, kertas saring, timbangan analitik, gelas ukur, corong pisah, alat refluks, botol semprot, gelas kimia, pipet tetes, termometer, *Electrothermal Melting Point* 9100, Spektrofotometer UV-Visibel SHIMADZU 1240, Spektrometer Massa, Spektrometer Infra merah, spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan spektrometer $^{13}\text{C-NMR}$. Sedangkan alat yang digunakan untuk studi *in silico* diantaranya komputer dengan *processor AMD Athlon (Neo) X2 Dual Core Processor L335 1,60 GHz* dengan kapasitas memori 2,00 GB dan *software* yang digunakan adalah *Marvin Sketch 5.2*, *ArgusLab*, *MMV (Molegro Molecular Viewer)* dan *ToxTree*.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk sintesis yaitu Isoniazid, 3-Nitrobenzoyl klorida, tetrahydrofuran p.a, trietilamin p.a, etanol p.a, Natrium Bikarbonat p.a, aquabidestillata, kloroform p.a, Silika gel 60 GF₂₅₄. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk studi *in silico* diantaranya reseptor InhA yang didownload dari *Protein Data Bank* (PDB).

Sintesis 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide

Isoniazid ditimbang sebanyak 10 mmol pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam labu alas datar yang kering lalu ditambah 15 mL tetrahydrofuran dan 3 mL trietilamin ke dalam labu alas datar tersebut. Lalu pada corong pisah kering masukan 5 mmol 3-Nitrobenzoyl klorida dan 15 mL tetrahydrofuran kocok secara perlahan. Kemudian teteskan sedikit demi sedikit ke dalam labu sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu kamar sampai habis. Selanjutnya campuran direfluks pada suhu $\pm 80-150 \text{ }^\circ\text{C}$ dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setiap jam hasil reaksi di dalam labu diuji KLT dengan menggunakan eluen etanol : kloroform dengan perbandingan 8 : 1 sampai didapat hasil satu spot. Selanjutnya hasil refluks diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai kental. Setelah itu ditambah natrium bikarbonat jenuh secukupnya untuk menghilangkan hasil samping HCl yang terbentuk sampai tidak keluar buih lagi. Lalu dicuci dengan aquadest secukupnya kemudian disaring dengan corong *Buchner* (Suzzana, 2010).

Rekristalisasi

Etanol absolut sebanyak 50-100 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL kemudian dipanaskan pada *hot plate*. Setelah mendidih senyawa hasil sintesis dimasukkan ke dalam larutan etanol panas sampai semua larut dan dihentikan pemanasan sampai pelarut tersisa setengahnya. 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 dikeringkan pada suhu $60 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 30-60 menit kemudian kristal ditimbang (Suzzana, 2010).

Uji kemurnian

Untuk mengetahui kemurnian senyawa hasil sintesis dilakukan dengan cara KLT, digunakan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak 1 = metanol : kloroform (9 : 1), fase gerak 2 = metanol : etil asetat (3 : 1), dan fase gerak 3 = etanol : *N*-heksan (3 : 1). Setelah dielusi dikeringkan, dilihat nodanya pada lampu UV kemudian ditentukan Rf sampel dan dibandingkan Rf pembanding. Noda tunggal yang timbul pada berbagai sistem fase gerak menunjukkan senyawa murni secara KLT. Uji kemurnian dilakukan juga dengan pengujian *melting point*.

Identifikasi dan Karakterisasi Struktur

Identifikasi dan karakteristik senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visibel, Spektrometer Inframerah, ¹H-NMR dan Spektrometer Massa untuk mengetahui struktur senyawa hasil sintesis (Silverstein, 1998).

Docking

Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide dan pembanding isoniazid di-docking-kan pada reseptor *enoyl-acyl carrier protein reductase* dengan menggunakan metode *ArgusDock* dengan *software* ArgusLab melalui beberapa tahapan.

Preparasi Senyawa

Senyawa digambar dengan menggunakan *software marvin sketch 5.2* lalu dioptimasi geometri, dengan diprotonasi pada pH 7,4 agar pH sesuai dengan pH dalam darah. Kemudian dilakukan *Conformation search* ini dilakukan untuk memperoleh energi yang terendah sehingga didapatkan 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 Inha yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB). Protein reseptor yang telah *download* ini kemudian dipilih senyawa 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 2. Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari 2Å maka metode yang digunakan tidak dapat dipercaya (Thompson, 2004).

Hasil yang diperoleh dari proses *docking* ini adalah berupa *energy best senyawad pose* atau berupa *binding affinity* senyawa/senyawa. Selanjutnya dari proses *docking* dapat dilihat interaksi antara senyawa dengan sisi aktif reseptor menggunakan *software* LigPlot (Wardani, 2012).

Screening Senyawa Based Drugs Likeness (Drugs scan)

Pengamatan obat dilakukan dengan memperhatikan *the rule of good medicine (Lipinski's rule of five)* dan Bioavailabilitas oral dari senyawa. Parameter yang digunakan yaitu berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5, donor ikatan hidrogen <5, aseptor ikatan hidrogen <10, dan *refractory* molar antara 40-130 (Lipinski etal, 1997). Parameter tersebut dapat dilihat dengan bantuan program *MarvinSketch 5.2*.

Uji toksisitas

Uji toksisitas dilakukan terhadap senyawa Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide dengan menggunakan *software ToxTree*. Parameter yang dilihat pada uji toksisitas ini adalah prediksi parameter *Cramer Rules*, *Kroes TTC decision tree* dan *Benigni / Bossa rulebase* (Harganingtiyas, 2012). *Cramer Rules* digunakan untuk melihat tingkatan toksisitas dilihat dari gugus fungsinya. *Kroes TTC decision tree* untuk memperkirakan ambang batas paparan senyawa obat pada manusia dan *Benigni / Bossa rulebase* untuk mengetahui apa senyawa tersebut dapat menyebabkan karsinogenisitas dan mutagenisitas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil sintesis selama 8 jam senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohydrazide diperoleh sebanyak 1,35 gram dengan presentase hasil yang didapat adalah 59,11%. Senyawa hasil sintesis berbentuk serbuk, berwarna kuning, baunya khas, tidak larut dalam air, sedikit larut dalam etanol dingin, 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 dengan KLT

Fase gerak	Replikasi	Rf hasil sintesis	Rf Isoniazid
Metanol :	1	0,67	0,52
kloroform	2	0,67	0,52
(9 : 1)	3	0,63	0,52
Metanol :	1	0,72	0,55
Etil asetat	2	0,71	0,55
(3 : 1)	3	0,66	0,55
Etanol : N-	1	0,65	0,53
heksan	2	0,65	0,53
(3:1)	3	0,77	0,53

Eluen metanol, etil asetat, kloroform dan n-heksan digunakan sebagai eluen. Hal ini ditujukan untuk menghasilkan kepolaran yang berbeda-beda, dimana campuran pelarut metanol dan kloroform merupakan eluen yang paling polar diantara yang lainnya. Uji kemurnian selanjutnya dilakukan dengan menguji jarak lebur senyawa hasil sintesis menggunakan alat *Electrothermal 9100*. Suatu senyawa dikatakan murni apabila selisih antara suhu lebur senyawa mulai melebur dengan suhu senyawa melebur seluruhnya adalah 2°C. Dari hasil uji di dapat titik lebur dari senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohydrazide yaitu 194,5-195,7°C. Titik lebur ini berbeda dengan titik lebur dari isoniazid (171-173 °C) dan 3-nitrobenzoiil klorida (275-278 °C).

Identifikasi dan Karakterisasi Struktur

Identifikasi dan karakterisasi dari senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri Ultraviolet, Spektrofotometri Infra merah, Spektrometri Resonansi Magnet Proton ($^1\text{H-NMR}$) dan Spektrometri Massa.

Identifikasi dan karakterisasi diawali dengan spektrofotometri UV-Vis. Pada spektrofotometri UV-Vis didapatkan panjang gelombang maksimum senyawa hasil sintesis yaitu ada pada panjang gelombang 365,5 nm. Panjang gelombang ini berbeda dari panjang gelombang maksimum isoniazid yaitu 265,0 nm.

Panjang gelombang senyawa hasil sintesis lebih besar daripada panjang gelombang isoniazid. Hal ini terjadi karena terjadinya suatu efek batokromik (pergeseran merah). Batokromik merupakan suatu pergeseran panjang gelombang maksimal ke arah panjang gelombang yang lebih panjang (Gholib, 2013). Efek ini terlihat apabila panjang sistem terkonjugasi bertambah. Selain itu efek ini juga terlihat bila sistem terkonjugasi disubstitusi dengan berbagai gugus (Creswell, 2005).

Selanjutnya identifikasi dilakukan dengan spektrofotometri Infra Merah. Spektrofotometri Infra Merah memberikan gambaran tentang gugus-gugus fungsi yang ada pada molekul hasil senyawa sintesis. Berdasarkan hasil identifikasi dengan spektrofotometri Infra merah diperoleh bilangan gelombang spektrum Infra Merah seperti pada tabel 4.2.

Tabel 2. Bilangan spektrum infra merah

Gugus fungsi/ jenis ikatan	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
Ulur -NH	3220,54
Ulur C=O	1646,91
- C=C- aromatis	1531,2
	1349,93
	856,239
Aromatis disubstitusi	713,533
	593,965

Dari tabel di atas, dapat dilihat beberapa puncak bilangan gelombang yang berasal dari gugus-gugus penting pada molekul senyawa *3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohidrazide*. Berdasarkan spektrum di atas gugus yang teridentifikasi antara lain C=O amida ($1646,91 \text{ cm}^{-1}$), ikatan N-H ($3220,54 \text{ cm}^{-1}$), ikatan C=C aromatis ($1531,2$ dan $1349,93 \text{ cm}^{-1}$).

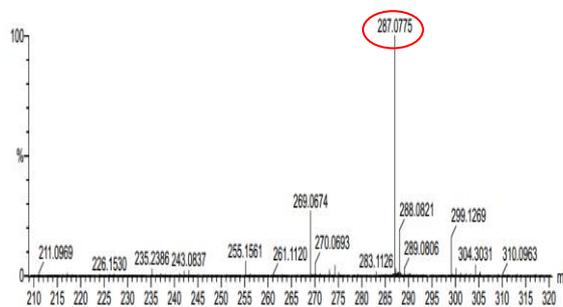
Identifikasi struktur dilanjutkan dengan menggunakan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$. Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ digunakan untuk mengetahui informasi tentang jenis hidrogen, jumlah hidrogen dan lingkungan hidrogen dalam suatu senyawa (Cresswell, 2005). Spektrum $^1\text{H-NMR}$ adalah grafik dari banyaknya energi yang diserap versus kuat medan magnet (Cresswell, 2005). Pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ yang dilihat adalah nilai geseran kimia. Berdasarkan spektrum di atas maka dapat dilihat

beberapa pergeseran kimia dan multiplisitas yang dihasilkan di jelaskan dalam tabel 3.

Tabel 3. Hasil Analisis Spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$

Pergeseran kimia(ppm)	Multiplisitas	Atom H dari gugus
7,727-7,756	Triplet	Satu atom H
8,036-8,045	Doublet	Dua atom H
8,459-8,474	Doublet	Dua atom H
8,536-8,549	Doublet	Satu atom H
8,760	Singlet	Satu atom H dari gugus -NH
8,839-8,848	Doublet	Satu atom H
8,889 - 8,898	Doublet	Dua atom H

Identifikasi dilanjutkan dengan spektrometri Massa. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Spektrum MS senyawa *3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohidrazide*

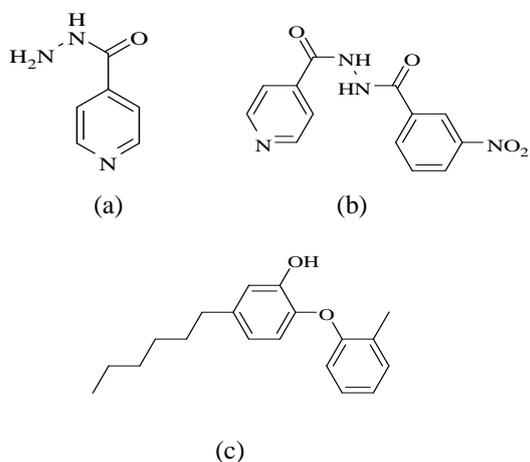
Dari spektrum spektrometri massa memperkuat dugaan bahwa hasil senyawa sintesis merupakan senyawa *3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohidrazide*. Berat molekul yang terlihat pada spektrum dibandingkan dengan berat molekul dari perhitungan menggunakan *software Chem Draw*. Hasilnya, didapat berat molekul 286,07.

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

Proses docking menggunakan program ArgusLab. Reseptor yang digunakan adalah *enoyl-acyl carrier protein reductase* (Kode PDB 2X23) dan senyawa alaminya yaitu TCU dan pembanding isoniazid (struktur pada gambar 2). Pada proses validasi ini digunakan 2 *docking engine* yaitu ArgusDock dan GADock. ArgusDock hanya memperhitungkan posisi tertentu/terarah dengan pendekatan strukturnya, sehingga hasil yang diperoleh bersifat *reproducible*. Sedangkan GADock memperhitungkan berbagai kemungkinan posisi yang ada sehingga hasil yang didapatkan tidak tetap (*non*

reproducible). Validasi dengan 2 docking engine ini dilakukan pada keadaan tanpa air pada reseptor karena keberadaan air dapat mempengaruhi interaksi ikatan senyawa-reseptor. Pada proses validasi ini nilai yang dilihat adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD).



Gambar 2. Struktur Kimia: (a) Isoniazid, (b) 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzohydrazide, dan (c) TCU

Grid box yang digunakan pada proses docking yaitu X : 11,25, Y : 20,75, Z : 12,25 angstrom. Nilai RMSD yang didapat dengan menggunakan docking engine ArgusDock adalah sebesar 1,37 Å. Sehingga pada penelitian ini digunakan docking engine ArgusDock karena nilai RMSD nya ≤ 2 yang menandakan bahwa metode yang digunakan *reliable*. Selain itu jika menggunakan ArgusDock hasil yang diperoleh bersifat *reproducible*.

Berdasarkan hasil docking antara senyawa dengan reseptor diperoleh konformasi senyawa dengan energi terkecil. *Binding affinity* merupakan ukuran kemampuan obat untuk berikatan pada reseptor. Ikatan kovalen menghasilkan afinitas kuat, interaksi stabil dan ireversibel. Ikatan elektrostatik bisa menghasilkan afinitas kuat atau lemah, biasanya bersifat *reversible*. Semakin kecil nilai *binding Affinity* maka afinitas antara reseptor dengan senyawa semakin tinggi begitu pula sebaliknya semakin besar nilai *binding Affinity* maka afinitas antara reseptor dengan senyawa semakin rendah. Nilai binding afinitas senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzo hydrazide dapat dilihat pada tabel 4. Nilai ini kemudian dibandingkan terhadap senyawa alami (TCU) dan obat isoniazid.

Berdasarkan hasil docking nilai *binding affinity* senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide adalah -9,18. Nilai ini lebih besar daripada *binding affinity* TCU. Tetapi dibandingkan dengan isoniazid senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-

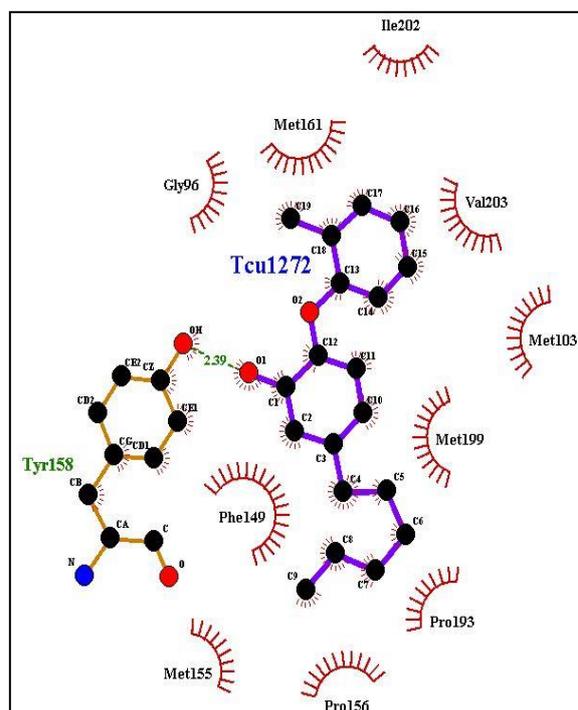
yl)carbonyl] benzohydrazide mempunyai interaksi yang lebih baik terhadap reseptor Inha sehingga berpotensi digunakan sebagai kandidat *lead compound* obat anti tuberkulosis.

Tabel 4. Perbandingan Nilai *Binding Affinity* (ΔG) Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide, TCU dan Isoniazid

Reseptor	ΔG 3-nitro-N'- [(pyridin-4-yl) carbonyl] benzo hydrazide (Kkal/mol)	ΔG TCU (Kkal/mol)	ΔG Isoniazid (Kkal/mol)
Inha (kode 2X23)	-9,18	-12,76	-7,14

Visualisasi Hasil Docking

Visualisasi hasil docking dilakukan untuk mengetahui interaksi antara senyawa dengan residu asam amino dari reseptor Inha. Adapun interaksi senyawa dapat dilihat pada gambar 3-5.

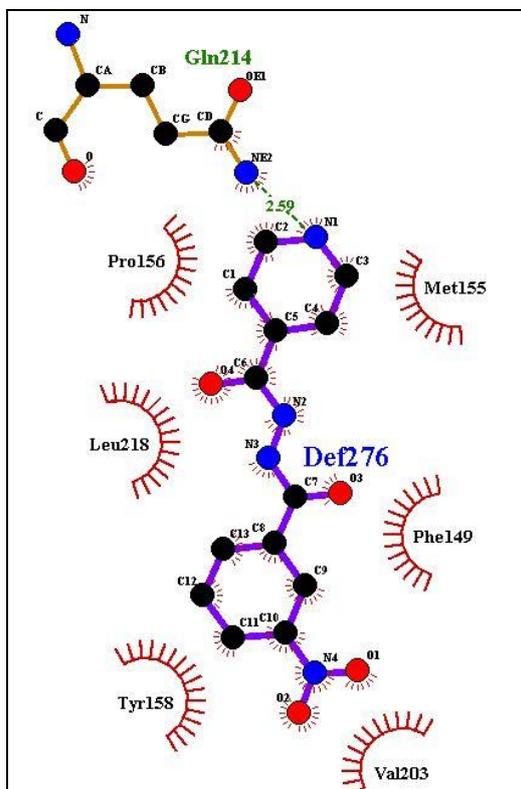


Gambar 3. Interaksi 2D antara TCU dengan Inha

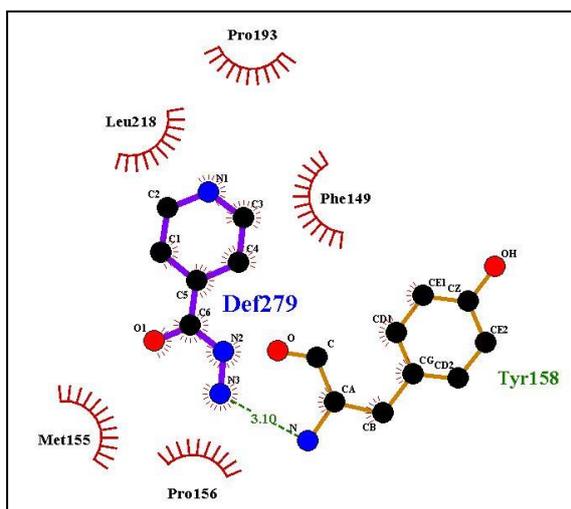
Dari gambar 3 dapat dilihat bahwa interaksi antara TCU dengan reseptor Inha terdapat 1 ikatan hidrogen yaitu dengan residu Tyr 158 dengan besarnya jarak ikatan hidrogen 2,39 Å, selain itu ada interaksi hidrofobik (10 residu asam amino) antara TCU dengan Inha.

Dari gambar 4 dapat dilihat bahwa interaksi antara 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide

dengan reseptor Inha terdapat 1 ikatan hidrogen yaitu dengan residu Gln 214 dengan besarnya jarak ikatan hidrogen 2,59 Å, selain itu ada interaksi hidrofobik (6 residu asam amino) antara senyawa dengan Inha.



Gambar 4. Interaksi 2D antara 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide dengan Inha



Gambar 5. Interaksi 2D antara Isoniazid dengan Inha

Dari gambar 5 dapat dilihat bahwa interaksi antara isoniazid dengan reseptor Inha terdapat 1 ikatan hidrogen yaitu dengan residu Tyr 158 dengan besarnya jarak ikatan hidrogen 3,10 Å, selain itu ada interaksi hidrofobik (5 residu asam amino) antara isoniazid dengan Inha.

Screening Senyawa Based Drugs Likeness (Drugs scan)

Penerapan aturan lipinski ini berhubungan dengan proses absorpsi atau permeabilitas terhadap lipid bilayer yang ada di dalam tubuh. 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. Jika berat molekul suatu senyawa > 500, artinya senyawa tersebut memiliki ukuran yang besar sehingga proses absorpsi akan semakin lama. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil Penapisan Aturan Lipinski

Parameter	Nilai	Keterangan
Donor Hidrogen	2	memenuhi
Akseptor Hidrogen	5	memenuhi
Berat Molekul	286,2429	memenuhi
Refractivity Molar	73,84	memenuhi
Log P	0,81	memenuhi

Berdasarkan data yang diperoleh, diketahui bahwa semua senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzo hydrazide memenuhi kelima aturan lipinski, yaitu Log P < 5, akseptor hidrogen < 10, donor hidrogen < 5, dan berat molekul < 500, serta refractivity molar 40-130, artinya senyawa tersebut memiliki absorpsi atau permeabilitas yang baik.

Uji Toksisitas

Pada uji ini digunakan 3 parameter toksisitas yaitu Cramer Rules untuk melihat tingkatan toksisitas dilihat dari gugus fungsinya, Kroes TTC decision tree untuk memperkirakan ambang batas paparan senyawa obat pada manusia dan Benigni / Bossa rulebase untuk mengetahui apa senyawa tersebut dapat menyebabkan karsinogenisitas dan mutagenisitas. Hasil uji toksisitas dapat dilihat pada tabel 6.

Berdasarkan parameter Cramer Rule's bahwa senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzo hydrazide memiliki toksisitas High (Class III), artinya dengan konsentrasi yang tinggi dari senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide tidak dijamin keamanan dalam penggunaannya. Class III menyebutkan bahwasubstansi dari struktur kimia ini dari segi keamanannya memberikan pengaruh awal yang tidak terlalu kuat. Tetapi substansi dari struktur kimia ini mungkin memberikan kesan memiliki toksisitas yang cukup berarti. Misalnya substansi heterosiklik dan heteroaromatik dan substansi siklik yang lain, beberapa mempunyai rantai samping dengan gugus fungsional yang reaktif. Uji Cramer Rule's ini berdasarkan gugus fungsi yang dimiliki oleh senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]

benzohydrazide. Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide memiliki gugus fungsi yang berkontribusi dalam peningkatan toksisitas, yaitu adanya gugus heteroaromatik.

Tabel 6. Hasil Uji Toksisitas Toxtree

Parameter	3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazid	Isoniazid
<i>Cramer Rules</i>	3. High (Class III)	3. High (Class III)
<i>Kroes TTC decision tree</i>	1. Negligible risk (low probability of life-time cancer risk greater than 1 in 10 ⁶)	2. Negligible risk (low probability of life-time cancer risk greater than 1 in 10 ⁶)
<i>Benigni / Bossa rulebase (for mutagenicity and carcinogenicity)</i>	3. Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity 9. Negative for nongenotoxic carcinogenicity	2. Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity 9. Negative for nongenotoxic carcinogenicity

Berdasarkan parameter *Kroes TTC decision tree* senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzohydrazide ambang batas paparan yaitu tidak lebih dari 0,15 µg/hari. Ini didasarkan pada analisis data dosis-respon untuk senyawa karsinogenik. Ambang ini memberikan 86-97 % kemungkinan bahwa beberapa resiko dapat berkurang jika diberikan pada atau di bawah dari 0,15µg/hari dan senyawa ini menjadi *genotoxic carcinogen*. Substansi dari struktur kimia ini tidak dianjurkan secara bebas untuk persediaan makanan tetapi cukup untuk menentukan jika substansi ini terdapat di dalam makanan, misalnya sebagai kontaminan.

Sedangkan untuk parameter *Benigni / Bossa rulebase* senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide memiliki struktur yang berkontribusi sebagai obat genotoksik karsinogenik. Salah satu gugus yang berkontribusi yaitu adanya gugus hydrazine yang terdapat pada struktur senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa (1) senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide dapat disintesis dari reaksi antara 3-nitrobenzoi klorida dengan isoniazid, (2) Senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl] benzo hydrazide mempunyai interaksi dengan reseptor Inha lebih baik daripada pembanding isoniazid dan (3) dari hasil uji *in silico* (*docking, drugs scan, toksisitas*) dapat

diprediksi senyawa 3-nitro-N'-[(pyridin-4-yl)carbonyl]benzo hydrazide dapat digunakan sebagai kandidat *lead compound* obat antituberkulosis yang lebih baik.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diucapkan kepada STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya yang telah mengijinkan digunakannya semua fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Barker, L F, Brennam, J.B, Rosenstein, P.K., & Sadoff, J C. (2009). Tuberculosis Vaccine Research : the Impact of Immunology. *Current Opinion in Immunology*, 21 (3), 331–338
- Benigni, R., Tcheremenskaia, O., & Worth, A. (2011). Computational Characterisation of Chemicals and Datasets in Terms of Organic Functional Groups - a New Toxtree Rulebase. *JRC Scientific and Technical Reports*, EUR 24871 : 1.
- Creswell, Clifford J, Olaf A. Runquist, Malcolm M Campbell. (2005). *Analisis Spektrum senyawa Organik*. Bandung : Penerbit ITB
- Firdaus, Ahmad, A. & Vega, M.C. (2013). Potensi 2-Feniletal Pentanoat untuk Meningkatkan Aktivitas Antibiotik InH, Am dan Eta Terhadap Mycobacterium Tuberculosis Strain H37Rv. *MANASIR*, 1 (1) : 75-82
- Harganingtias, R. (2011). *Modifikasi (1R,2R,3R,5R)-(-)-Isopinocampheylamine sebagai inhibitor M2 proton channel pada Virus Influenza A Subtipe H1N1 Secara In Silico* [Skripsi]. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., & Feeney, P.J., (1997): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting, *Adv. Drug Del. Rev.*, 23, 3-26.
- Lourenço, M.C.D.S., Ferreira, M.D.L., de Souza, M.V.N., Peralta, M.A., Vasconcelos, T.R.A., & Henriques, M.D.G.M.O (2007). Synthesis and anti-mycobacterial activity of (E)-N-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (6), 1344–1347.
- Malhotra, M., Arora, M., Samad, A., Sahu, K., Phogat, P. & Deep, A. (2011). Synthesis and Evaluation of Some Novel derivatives of 2-Propoxybenzylideneisonicotinohydrazide for Their Potential Antimicrobial activity. *Journal of The Serbian Chemical Society*. 589-597
- Rintiswati N., Wijayanti Y . (1999). Kepekaan *M. tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberculosis, *Berkala Ilmu Kedokteran*. 31 : 77-83
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., & Morrill, T.C. (1998). *Spectrometric Identification of Organic*

- Compound*, 4th Ed. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Somantri, I. (2007). *Asuhan Keperawatan pada Pasien dengan Gangguan Sistem Pernapasan*. Jakarta : Salemba Medika
- Suzana, & Budiarti, T. (2010). Pengaruh Gugus Nitro dengan Posisi Para (p) pada Sintesis N-(4-Nitrobenzoil)tiourea. *Majalah Farmasi Airlangga*, 8 (1), 15-19.
- Thompson. (2004). *ArgusLab 4.0.1*. Planaria Software LLC., Seattle, Wash, USA.
- Wardani, F. (2012). *Studi Derivat Ribavirin dan GTP sebagai Inhibitor Untuk NS5 Metiltransferase Virus Denger* [Skripsi]. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Widyanto, F Candra dan Tribowo, C. (2013). *Trend Disease : Trend Disease Penyakit Saat Ini*. Jakarta : Trans Info Media.
-