

Uji In Vitro dan Studi *In Silico*
Senyawa Turunan *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide
sebagai Kandidat Antituberkulosis
(In Vitro and In Silico Study of *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide
as Antituberculosis Candidate)

RUSWANTO RUSWANTO^{1*}, NUR RAHAYUNINGSIH¹, NUR LAELI DWI HIDAYATI¹,
GINNA SRI NURYANI¹, RICHA MARDIANINGRUM²

¹Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada Tasikmalaya,
Jl. Cilolohan No. 36 Kota Tasikmalaya 46115

²Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan, Universitas Perjuangan Tasikmalaya
Jl. Pembela Tanah Air 177 Kota Tasikmalaya 46115

*Penulis korespondensi, Hp : 082121745574

e-mail: ruswanto@stikes-bth.ac.id

Diterima 29 Januari 2019, Disetujui 12 September 2019

Abstrak: Telah dilakukan penelitian tentang studi in vitro dan *in silico* senyawa turunan *N*-Benzoylisonicotinohydrazide. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa senyawa turunan *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide dapat menghambat aktivitas bakteri gram positif, gram negatif, dan *Mycobacterium tuberculosis*, serta mempunyai interaksi yang baik dengan *enoyl-acyl carrier protein reductase* dari *Mycobacterium tuberculosis*. Dari uji in vitro dihasilkan bahwa senyawa *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide memiliki *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedangkan besarnya MIC senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) adalah sebesar 3,125 µg/mL. Dari studi *in silico* didapat bahwa nilai *binding affinity* antara senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dan enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) mempunyai *binding affinity* yang paling kecil sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut mempunyai interaksi yang stabil dan paling baik dibanding senyawa-senyawa lainnya. Dengan demikian, senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dapat digunakan sebagai kandidat antituberkulosis yang lebih poten.

Kata kunci: Tuberculosis, in vitro, *in silico*, *N*-Benzoylisonicotinohydrazide.

Abstract: There have been in silico and in vitro studies of *N*-Benzoylisonicotinohydrazide derivatives as antituberculosis candidates. The aims of this research were determined that the *N'*-benzoylisonicotinohydrazide derivatives could inhibit the activity of gram-positive, gram-negative, and *Mycobacterium tuberculosis*, as well as having good interactions with *enoyl-acyl carrier protein reductase* from *Mycobacterium tuberculosis*. From the in vitro test it was found that the *N'*-benzoylisonicotinohydrazide compound had a *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) of 0.33 µg/mL against the *Bacillus subtilis*, while the MIC of *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide against *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) was 3.125 µg/mL. From the in silico study, it was found that the *binding affinity* value between *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide enzyme *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) had the smallest *binding affinity* so that it could be predicted that it had a stable interaction than other compounds. Therefore the *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide could be used as a more potent antituberculosis candidate.

Keywords: Tuberculosis, in vitro, in silico, *N*-Benzoylisonicotinohydrazide.

PENDAHULUAN

TUBERKULOSIS merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikrobakteria. Mikrobakteria penyebab tuberkulosis yaitu *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv), dapat ditularkan melalui udara saat pasien tuberkulosis batuk dan percikan ludah yang mengandung bakteri tersebut terhirup oleh orang lain saat bernafas. *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) merupakan suatu basil gram positif. Basil mikrobakteri ini sangat sukar dibunuh dan sesudah pengobatan kemoterapi eliminasi basil dari tubuh sangat lambat sehingga pengobatan infeksi mikrobakteri memerlukan waktu lama⁽¹⁾.

Salah satu pengobatan tuberkulosis dapat menggunakan obat isoniazid. Penemuan isoniazid adalah tonggak utama dalam kemoterapi tuberkulosis. Isoniazid merupakan salah satu senyawa yang banyak digunakan dalam penemuan dan pengembangan obat. Banyak peneliti yang telah melakukan pengembangan obat dengan modifikasi molekul dan mensintesis turunan isoniazid yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru, dimana beberapa turunan isoniazid menunjukkan aktivitas isoniazid terhadap tuberkulosis⁽²⁻⁵⁾.

Untuk mengurangi resistensi obat antituberkulosis seperti isoniazid, banyak peneliti melakukan pengembangan obat untuk menemukan senyawa baru dengan aktivitas yang lebih baik. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan sintesis tiga senyawa turunan *isonicotinohydrazide* yaitu senyawa *N'-(4-fluorobenzoyl)-isonicotinohydrazide*, *N'-(3-bromobenzoyl) isonicotinohydrazide*, *N'-(3-chlorobenzoyl) isonicotinohydrazide*⁽⁶⁾.

Dalam pengembangan obat tidak hanya modifikasi molekul dan sintesis senyawa, tetapi perlu dilakukannya penelitian secara *in vitro* terhadap senyawa yang telah dimodifikasi⁽⁷⁾. Untuk membuktikan bahwa tiga senyawa turunan isoniazid yang telah disintesis mempunyai aktivitas sebagai kandidat anti tuberkulosis, maka peneliti telah melakukan uji secara *in vitro* terhadap bakteri gram positif dan spesies mikrobakteri termasuk *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv). Selain uji *in vitro*, peneliti juga telah melakukan studi interaksi secara *in silico* antara senyawa-senyawa tersebut dengan enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* dari *Mycobacterium tuberculosis*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Turunan senyawa isoniazid yaitu *N-Benzoylisonicotinohydrazide* (a), *N'-(2-*

Chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide (b), *N'-(2-Flurobenzoyl)isonicotinohydrazide* (c) dan isoniazid (d). Bahan-bahan dalam studi *in silico* diantaranya struktur senyawa turunan isoniazid yang dibuat dengan *MarvinSketch* versi 5.2.5.1 dan reseptor tuberkulosis yang didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan alamat web <http://www.rcsb.org/pdb/>. Bahan dalam studi *in vitro* yaitu tiga senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohydrazide*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, media *Middlebrook 7H9*, media natrium agar, *Mueller hinton agar*, resazurin, NaCl, dimetilsulfoksida, aquadest steril.

Alat. Peralatan untuk studi *in silico* diantaranya perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi model sistem: Acer dengan *processor* N2840 RAM (*Random Acces Memory*) 2 *gigabyte*, perangkat lunak yang digunakan adalah *AutoDock*, *Marvin Sketch* versi 5.2.5.1, *Pose view*, *PreADMET*. Peralatan untuk studi *in vitro* adalah cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, jarum ose, erlenmeyer, *beaker glass*, pipet mikro, bunsen, besi pelubang, *autoclave*, inkubator, rak tabung, pipet ukur, *microplate*, *laminar air flow*.

METODE. Studi In Vitro: Uji Aktivitas Antibakteri. Suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 1 mL, dimasukan media *mueller hinton agar* 20 mL, dihomogenkan dengan cara digoyangkan membentuk angka delapan dan tunggu media sampai padat. Kemudian dilakukan metode sumuran dengan cara dibuat 4 lubang yang akan dimasukan larutan uji dengan konsentrasi bervariasi 100-0,195 µg/mL. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam⁽⁸⁾.

Uji Aktivitas Antituberkulosis. Uji antimikobakteri dilakukan dengan *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). Larutan senyawa dengan konsentrasi 100-0,195 µg/mL yang telah dilarutkan dimasukan kedalam *microplate* untuk pengontakan dengan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sebanyak 30 µL. Media *middlebrook 7H9* sebanyak 100 µL dimasukan kedalam setiap sumur pada *microtiter plate*. Setelah 7 hari inkubasi, 30 µL larutan resazurin ditambahkan ke setiap sumur dan kembali diinkubasi 24 jam. Setelah hari ke 8, diamati apakah terjadi perubahan warna dari biru (bakteri tidak tumbuh) proses oksidasi menjadi merah muda (bakteri tumbuh) proses reduksi⁽⁹⁾.

Studi In Silico: Screening Ligand Based Drug Likeness. *Drug Scan* digunakan untuk mengamati sifat kesamaan dengan obat yang telah ada (*drug likeness*) dilakukan menggunakan aturan *the rule of good medicine* (*Lipiniski's rule of five*) dan bioavailabilitas oral dari ligan. Parameter yang digunakan diantaranya berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5, donor

ikatan hidrogen <5, aseptor ikatan hidrogen <10 dan *refractory molar* antara 40-130. Parameter tersebut ditentukan menggunakan *software MarvinSketch 5.2.5.1*^(10,11).

Preparasi Ligan. Ligan digambar menggunakan *software MarvinSketch 5.2.5.1* dalam bentuk dua dimensi selanjutnya dilakukan optimasi geometri pada ligan, diprotonasi pada pH 7,4. Ligan disimpan dengan format *file.mrv*. Kemudian dilakukan *Conformational search* lalu simpan hasil pencarian konformasi dengan format *file .mol2*^(12,13).

Validasi Metode Docking. Parameter yang digunakan untuk validasi *docking* ini adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Metode *docking* dikatakan valid apabila nilai RMSD yang diperoleh adalah ≤ 2 ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Docking Ligan Uji terhadap Reseptor. Untuk melakukan *docking* dari senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide* digunakan *software Autodock*. Reseptor hasil validasi dimasukkan ke dalam *software* tersebut lalu digunakan ligan alami yang digunakan untuk proses validasi. Selanjutnya *gridbox* diatur sesuai dengan hasil yang telah dipakai untuk proses validasi. Hasil yang diperoleh berupa *binding affinity* terendah dan konstanta inhibisi⁽¹⁶⁾.

Prediksi ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) dan Toksisitas. Pada penelitian ini dilakukan prediksi ADME pada senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide*. Struktur senyawa ini dikonversi menjadi *mol file* (*.mol) lalu dimasukkan pada program *PreADMET*, yang secara otomatis menghitung penyerapan prediksi untuk sel Caco-2, HIA (*Human Intestinal Absorption*), dan protein plasma yang terikat. Kemudian dilakukan uji toksisitas terhadap senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide* dengan program *PreADMET*⁽¹⁷⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi In Vitro: Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif.

Penentuan uji aktivitas antibakteri pada senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide*, *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide*, dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide* bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*) dan gram negatif (*Escherichia coli*).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1. Aktivitas tertinggi pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan aktivitas terendah senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide* pada konsentrasi 0,781 $\mu\text{g/mL}$, *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotino hidrazide* pada konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide* pada konsentrasi 1,562 $\mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas antibakteri ketiga senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohidrazide* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan terbentuknya zona hambat (bakteriostatik).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada Tabel 2. Uji aktivitas terhadap bakteri *Bacillus subtilis* menunjukkan bahwa senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohidrazide* memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan adanya zona hambat yang terbentuk. Senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide* memberikan aktivitas yang lebih baik dibandingkan senyawa *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide* dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotino hidrazide*, hal ini dikarenakan senyawa tersebut memiliki konsentrasi paling rendah yaitu 0,391 $\mu\text{g/mL}$ sehingga mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *Bacillus subtilis*.

Tabel 1. Diameter daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
0,195	0	0	0
0,391	0	0	0
0,781	2,20 \pm 0,14	0	0
1,562	3,35 \pm 0,21	0	3,70 \pm 0,07
3,125	5,60 \pm 0,14	0	4,05 \pm 0,42
6,25	5,40 \pm 0,14	0	4,70 \pm 0,07
12,5	6,35 \pm 0,21	4,35 \pm 0,57	5,13 \pm 0,04
25	8,50 \pm 0,28	4,75 \pm 0,71	5,31 \pm 0,06
50	9,90 \pm 0,42	4,90 \pm 0,64	5,85 \pm 0,71
100	16,50 \pm 0,42	5,13 \pm 0,88	6,05 \pm 0,85

Tabel 2. Diameter daya hambat terhadap *Bacillus subtilis*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
0,195	0	0	0
0,391	4,25 ± 0,07	0	0
0,781	4,60 ± 0,14	0	0
1,562	4,85 ± 0,07	0	0
3,125	5,30 ± 0,28	3,30 ± 0,07	2,55 ± 0,42
6,25	6,40 ± 0,14	3,65 ± 0,15	3,10 ± 0,07
12,5	6,90 ± 0,28	3,80 ± 0,07	3,35 ± 0,28
25	7,45 ± 0,07	4,00 ± 0,21	3,50 ± 0,35
50	7,60 ± 0,14	4,60 ± 0,07	3,80 ± 0,07
100	8,30 ± 0,71	5,30 ± 0,49	4,40 ± 0,64

Tabel 3. Diameter daya hambat terhadap *Escherichia coli*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Cloro	2-Floro
0,195	0	0	0
0,391	0	0	0
0,781	3,18 ± 0,11	0	0
1,562	3,28 ± 0,04	0	0
3,125	3,40 ± 0,07	0	2,80 ± 0,07
6,25	3,60 ± 0,07	0	3,00 ± 0,14
12,5	3,73 ± 0,04	2,85 ± 0,42	3,25 ± 0,14
25	3,90 ± 0,07	3,20 ± 0,07	3,58 ± 0,14
50	3,95 ± 0,28	3,60 ± 0,35	3,80 ± 0,07
100	4,65 ± 0,42	4,50 ± 0,49	4,00 ± 0,64

Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 3. Dari hasil uji aktivitas senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide terhadap bakteri *Escherichia coli*, ketiga senyawa tersebut dapat memberikan aktivitas dengan adanya daya hambat yang terbentuk. Namun aktivitas yang lebih baik terdapat pada senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide dengan konsentrasi terendah 0,781 µg/mL dengan diameter zona hambat 3,18 mm. Sifat aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona hambat, dimana zona hambat yang dihasilkan termasuk kategori sangat lemah. Menurut Muharni (2017), suatu antibakteri atau antibiotik dikatakan mempunyai aktivitas terhadap bakteri jika mempunyai kekuatan sebagai berikut: bila memberikan nilai zona hambat dengan ukuran 6-10 mm dikategorikan lemah, 11-20 mm dikategorikan aktif, dan 21-30 mm atau lebih dikategorikan sangat aktif. Perbedaan zona hambatan untuk masing-masing konsentrasi dapat disebabkan oleh perbedaan besar kecilnya konsentrasi⁽¹⁸⁾.

Uji aktivitas antibakteri dari senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazine dilakukan dengan metode difusi sumuran. Berdasarkan Prayoga (2013), kelebihan dari metode sumuran yaitu terjadi proses osmolaritas konsentrasi yang lebih tinggi dari metode difusi *disk*. Pada metode sumuran setiap lubang diisi dengan konsentrasi larutan senyawa maka osmolaritas terjadi lebih menyeluruh dan lebih homogen serta konsentrasi yang dihasilkan lebih tinggi dan lebih kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri⁽¹⁹⁾.

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki hambatan tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif pada konsentrasi 100 µg/mL, hal ini sesuai yang dikatakan oleh Auliyah (2016) bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi aktivitas antibakteri, sehingga terbentuknya zona hambat yang kuat. Senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki struktur kimia yang terdapat atom N, kontribusi atom N dapat memberikan efektifitas interaksi kimiawi dengan

reseptor pada masing-masing bakteri. Sehingga senyawa kimia memiliki struktur yang spesifik dengan fungsi yang spesifik, artinya senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide secara in vitro dapat berfungsi sebagai antibakteri⁽²⁰⁾.

Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO (dimetil sulfoksida) tidak memiliki aktivitas, akan tetapi berfungsi untuk melarutkan suatu senyawa hasil sintesis atau pun ekstrak, sedangkan kontrol positif menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Untuk pengujian ini, antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif yaitu isoniazid.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri dari senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, dilakukan uji penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari konsentrasi terendah yang memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*.

Hasil Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Penentuan MIC dilakukan terhadap bakteri gram positif dan negatif berdasarkan konsentrasi terendah dari aktivitas masing-masing senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide. Hasil penentuan MIC dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 pada penentuan MIC terhadap bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa dari ketiga senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide mampu memberikan aktivitas MIC pada konsentrasi 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dibandingkan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hal ini dikarenakan bakteri *Bacillus subtilis* memiliki struktur dinding sel bakteri lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja.

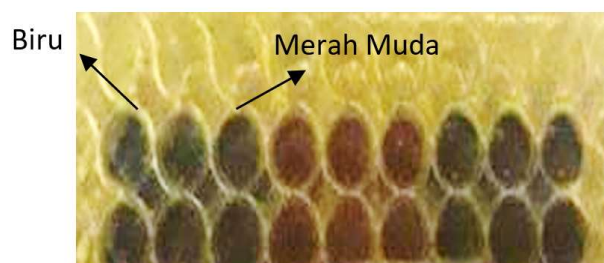
Pada bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki peptidoglikan pada dinding sel lebih tebal sehingga membentuk suatu struktur yang kaku. Sedangkan bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* merupakan kelompok bakteri gram negatif yang mempunyai sifat kurang rentan terhadap beberapa antibiotik. Struktur dinding sel bakteri gram negatif relatif lebih kompleks dan berlapis tiga dimana lapisan luar berupa lipoprotein,

lapisan tengah berupa lipopolisakarida, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan. Berdasarkan Mambang (2014), salah satu mekanisme antibiotik ialah merusak struktur dinding sel pada membran plasma sehingga kemampuan membran plasma sel bakteri sebagai penghalang osmosis menjadi berkurang dan mengganggu sejumlah biosintesis yang diperlukan dalam membran⁽²¹⁾.

Hasil Uji Aktivitas Antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv). Uji aktivitas antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) dilakukan menggunakan metode *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). Metode REMA merupakan salah satu metode yang baru dikembangkan dimana dapat memberikan hasil uji sensitivitas obat antituberkulosis (OAT) yang cepat dan tepat dengan pengerjaan yang lebih sederhana⁽⁹⁾.

Pada metode REMA pembacaan hasil dilakukan dengan melihat warna yang terbentuk. Pada hari ke-8 tidak ada perubahan warna pada medium yang telah diberikan indikator resazurin maka hasil dinyatakan negatif. Metode ini menggunakan medium cair *middlebrook 7H9* dan pengamatannya menggunakan indikator redoks yaitu resazurin. Resazurin memiliki warna biru yang tidak berfluoresens dan dapat tereduksi menjadi warna merah muda yang berfluoresens dalam bentuk resorufin, dimana berubah warna ini untuk mendeteksi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*⁽²²⁾. Adapun perubahan warna pada pengujian *Mycobacterium tuberculosis* terdapat pada Gambar 1.

Mycobacterium tuberculosis merupakan penyebab penyakit tuberkulosis. Munculnya strain resisten antibiotik spesies ini menggarisbawahi kebutuhan



Gambar 1. Pengujian *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabel 4. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

Jenis Bakteri	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (µg/mL)			
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro	INH (+)
Gram Positif				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,65	10,42	1,21	6,25
<i>Bacillus subtilis</i>	0,33	2,26	2,35	3,13
Gram Negatif				
<i>Escherichia coli</i>	0,65	10,42	2,35	2,60

obat baru yang efektif terhadap mikobakteria yang resisten terhadap obat antituberkulosis lini pertama. Penggunaan obat yang resisten ini dapat dikembangkan dengan mencari turunan dari suatu senyawa obat untuk didapatkan efektivitasnya sebagai antimikobakteri. Isoniazid merupakan obat lini pertama yang sudah resisten penggunaannya, maka dalam penelitian ini senyawa turunan isoniazid dilakukan uji secara *in vitro* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) untuk mengetahui aktivitas senyawa obat baru sebagai obat antituberkulosis (Tabel 5).

Dari hasil penelitian ketiga senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv), akan tetapi senyawa *N'*-(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide memiliki potensi yang lebih besar untuk menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) dengan nilai MIC 3,125 µg/mL dari konsentrasi tertinggi 100 µg/mL. Hal ini karena senyawa turunan senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki lipofilitas yang lebih tinggi daripada kontrol positif yaitu isoniazid, sehingga senyawa tersebut lebih mudah masuk ke dalam sel bakteri.

Menurut Setiabudy (2016), isoniazid secara *in vitro* bersifat tuberkulostatik dan tuberkulosis. Isoniazid dapat menghambat biosintesis asam mikolat yang merupakan unsur penting dalam dinding sel mikrobakterium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai MIC 3,125 µg/mL⁽²³⁾.

Studi *In Silico*: Docking. Proses *docking* menggunakan program *AutoDock*. Reseptor yang digunakan adalah 1KZN, 1JJJ dan 2x23. Pada proses validasi ini nilai yang dilihat adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Reseptor 1JJJ dan 2x23

memiliki nilai RMSD ≤ 2 Å. Akan tetapi reseptor 1KZN tidak memenuhi syarat dimana nilai RMSD ≥ 2 Å, sehingga reseptor 1KZN dianalisis kualitas stereokimianya (Ramachandran Plot). Hasil analisis menggunakan Ramachandran Plot diperoleh nilai *disallowed region* berada dibawah 0,8% yaitu 0,6%. Pada analisis reseptor juga dilakukan dengan melihat nilai *most favored region* (daerah yang disukai) dimana kualitas yang baik memiliki persentase *most favored region* lebih besar dari 50%. Hasil menunjukkan persentase *most favored region* sebesar 89,9%.

Berdasarkan hasil *docking* antara senyawa dengan reseptor diperoleh konformasi senyawa dengan energi terkecil. 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⁽²⁴⁾. Nilai *binding affinity* senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide dapat dilihat pada Tabel 6. Dari data yang diperoleh ditunjukkan bahwa pada reseptor antibakteri menunjukkan nilai energi bebas ikatan (*binding affinity*) senyawa uji lebih rendah daripada ligan alami dan senyawa pembanding sehingga interaksi obat dengan reseptor stabil. Sedangkan pada reseptor tuberkulosis nilai *binding affinity* dari ketiga senyawa uji yang lebih rendah yaitu *N'*-(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide sebesar -7,50 kkal/mol, ligan alami sebesar -7,31 kkal/mol, dan isoniazid -4,47 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji lebih baik dari ligan alami dan isoniazid karena energi bebas ikatannya lebih rendah dari isoniazid sehingga interaksi tersebut stabil.

Visualisasi Hasil *Docking*. Visualisasi hasil *docking* dilakukan untuk mengetahui interaksi antara senyawa dengan residu asam amino dari reseptor

Tabel 5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv).

Jenis bakteri	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)			
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro	INH (+)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25	3,125	6,26	3,125

Tabel 6. Perbandingan nilai *binding affinity* senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, ligan alami dan isoniazid.

Kode PDB	Senyawa	Nilai <i>binding affinity</i> (kkal/mol)	Konstanta inhibisi (µM)
1KZN	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-6,72	11,84
	Isoniazid	-4,91	251,72
	Ligan Alami	-5,42	105,62
1JJJ	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-6,71	12,07
	Isoniazid	-4,54	467,73
	Ligan Alami	-6,15	31,15
2x23	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-7,02	7,1
	<i>N'</i> -(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide	-7,50	3,2
	<i>N'</i> -(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide	-6,35	22,18
	Isoniazid	-4,47	528,83
	Ligan Alami	-7,31	4,39

Tabel 7. Hasil visualisasi ligan pada reseptor.

PDB ID	Ligan	Asam amino	
		Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
1KZN	Ligan alami	Arg136	Pro79, Ile90, Asn46, Ala47
	Ligan uji	Asn46	Glu50, Ile78
1JIJ	Ligan alami	Asp40, Asp195, Asp177, Gly38, His50	Gly38
	Ligan uji	Gly193, Gly38	Cys37, Gly38
2x23	Ligan alami	Tyr158	Ala157, Met103, Ile215, Ile202, Val203, Met161, Ala198, Leu218, Phe149
	Ligan uji	Ile194, Pro156	Phe149

1KZN, 1JIJ dan 2X23. Adapun interaksi senyawa dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan data hasil visualisasi, semakin banyak ikatan ligan dengan asam amino reseptor maka semakin dekat jarak antara ikatan, maka ikatan yang dihasilkan akan semakin stabil (kuat) dan baik. Adanya ikatan hidrogen dapat mempengaruhi sifat fisika kimia obat sehingga berperan penting terhadap aktivitas biologis obat.

Screening Ligand Based Drug Likeness. Dari hasil uji *drug scan* diketahui bahwa senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide* memiliki berat molekul <500 g/mol sehingga senyawa akan mudah diabsorpsi. Log P <5 berhubungan dengan lipofilitas atau hidrofobisitas molekul obat yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid, atau pelarut non polar. Donor ikatan hidrogen <5 dan aseptor ikatan hidrogen <10 berhubungan dengan aktivitas biologis dari molekul obat. *Refractory molar* antara 40-130 dimana nilai ini merupakan ukuran nilai total polarisabilitas dari molekul obat. Sehingga semua senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide*

memenuhi aturan Lipinski. Hasil *Drug Scan Likeness* terdapat pada Tabel 8.

Prediksi ADME dan Toksisitas. Prediksi ADME ini dilakukan untuk memprediksi sifat farmakokinetik yaitu absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi didalam tubuh secara *in silico*. Parameter yang digunakan diantaranya Caco-2 digunakan untuk menentukan nilai permeabilitas senyawa, parameter HIA (*Human intestinal Absorption*) untuk memprediksikan proses penyerapan obat didalam usus manusia, dan parameter *Protein Plasma Binding* untuk mengetahui nilai dalam persen suatu obat yang terikat dengan protein plasma. Tabel 8 menunjukkan bahwa semua senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide* memenuhi syarat dimana Caco-2 4-70 nm/sec, HIA 70-100 %, *Protein Plasma Binding* 90 %. Hasil data prediksi ADME dan toksisitas terdapat pada Tabel 9. Pada uji toksisitas hasil menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut memiliki efek mutagenik.

Tabel 8. Hasil *drug scan*.

Parameter	Hasil		
	N-benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
Berat Molekul	241,245	275,69	259,236
Lipofilisitas (Log P)	0,87	1,47	1,01
Donor ikatan hidrogen	2	2	2
Aseptor ikatan hidrogen	5	6	6
Refraktori molar	66,52	71,32	66,73

Tabel 9. Hasil *drug scan*.

Senyawa	Parameter	Hasil	Keterangan
<i>N'-(2-Chloro benzoyl)isonicotinohydrazide</i>	Caco-2 (nm/sec)	18,5589	Sedang
	HIA (%)	93,057875	Baik
	<i>Plasma protein binding</i> (%)	81,444766	Ikatan Kimia Lemah
<i>N'-benzoyl isonicotinohydrazide</i>	Caco-2 (nm/sec)	21,0139	Sedang
	HIA (%)	91,917087	Baik
	<i>Plasma protein binding</i> (%)	69,713785	Ikatan Kimia Lemah

SIMPULAN

Senyawa *N'*-benzoylisonicotinohydrazide memiliki MIC sebesar 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedangkan besarnya MIC senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv) adalah sebesar 3,125 µg/mL. Dari studi *in silico* dapat dilihat bahwa nilai *binding affinity* antara senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) mempunyai *binding affinity* yang paling kecil sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut mempunyai interaksi yang stabil dan paling baik dibanding senyawa-senyawa lainnya sehingga senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dapat digunakan sebagai kandidat antituberkulosis yang lebih poten.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi atas dana hibah penelitian PDUPT 2017-2019.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siswandono. Kimia Medisinal edisi II. Surabaya: Airlangga University Press. 2016.
2. Alea GV, Lagua FMG, Caparas MNS. Synthesis and Characterization of Methyl-2-hydroxy-5- [(1)-1-[2-zinylidene] butyl} benzoate, a New Isonicotinoyl hydrazone Derivative of Methyl Salicylate. DLSU Research Congress Manila. 2014; 1-5.
3. Cassano R, Trombino S, Ferrarelli T, Cavalcanti P, Giraldi C, Lai F, et al. Synthesis, characterization and in-vitro antitubercular activity of isoniazid-gelatin conjugate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012. 64(5). 712–8. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01461.x.
4. Coelho TS, Cantos JB, Bispo MLF, Gonçalves RSB, Lima CHS, da Silva PEA, et al. In vitro antimycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives against isoniazid-resistant strains. *Infectious Disease Reports*. 2012. 4(1), 49–51. DOI: 10.4081/idr.2012.e13.
5. Hearn M. and Cynamon M. In Vitro and In Vivo Activities of Acylated Derivatives of Isoniazid Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Design and Discovery*. 2003. 18(4), 103–8. DOI: 10.1080/10559610390450705.
6. Ruswanto, Mardianingrum R, Nofianti T, and Rahayuningsih N. Synthesis and Molecular Docking of Isonicotinohydrazide Derivatives as Anti-tuberculosis Candidates. *Mal. J. Fund. Appl. Sci.* 2019; 15(3). 367-71
7. Tiruveedhula., et al. Design and synthesis of novel antimicrobials with activity against Gram-positive bacteria and mycobacterial species, including *M. tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013; 7830–40.
8. Zaenab, dkk. Uji antibakteri siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap *Streptococcus mutans* (ATC31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*. *Makara Kesehatan*. 2004; 8(2):37-40.[diakses 16 Mei 2014]. <http://journal.ui.ac.id/health/article/download/287/283>.
9. Purnamasari., et al. Perbandingan Metode Proporsi dengan Metode *Resazurin Microtiter Assay* (Rema) untuk Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* yang Resisten Terhadap Rifampisin. *Jurnal Medula*. 2015. 2(2).
10. Choy YB and Prausnit, MR. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: Ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharmaceutical Research*. 2011. 28(5). 943–8. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0292-6>.
11. Athar M, Lone MY, Jha PC. First protein drug target's appraisal of lead-likeness descriptors to unfold the intervening chemical space. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2017. 72: 272–82. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.12.019>.
12. Ruswanto R, Nofianti T, Mardianingrum R, Lestari T, Sepriyani A. Desain dan Studi In Silico Senyawa Turunan Kuwanon-H sebagai Kandidat Obat Anti HIV Design and In Silico Study of Kuwanon-H as Anti HIV Drug Candidate. *Jurnal Kimia Valensi*. 2018. 4(1): 57–66.
13. Ruswanto, Mardianingrum R, Novitriani K. Sintesis Dan Studi in Silico Senyawa 3-NitroN'-[(Pyridin-4-YI) Carbonyl] Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis. *Jurnal Chimica et Natura Acta*. 2015. 3(2): 54-61.
14. Trott O, dan Olson AJ. Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2009. ol. 31, No. 2.
15. Herlina T, Mardianingrum R, Gaffar S, Supratman U. Isoquinoline Alkaloids from *Erythrinapoeppigiana* (Leguminosae) and Cytotoxic Activity Against Breast Cancer Cells Line MCF-7 In Silico. *J. Phys.: Conf. Ser.* 821. 2017. doi:10.1088/1742-6596/812/1/012091.
16. Ruswanto R, Mardianingrum R, Lestari T, Nofianti T, Tuslinah L, dan Nurmalik D. In silico study of the active compounds in bitter melon (*Momordica charantia* L) as antidiabetic medication. *Pharmaciana*. 2018.8(2). 176–194.
17. Ruswanto, Richa M, Tita N, Tresna L. Molecular Docking of 1-Benzoyl-3-Methylthiourea as Anti Cancer Candidate and Its Absorption, Distribution, and Toxicity Prediction. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. 9(5): 680–4.
18. Muharni, Fitrya., dan Sofa F. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di

- Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2017. 7(2). 127-35.
19. Prayoga. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Prodi Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah. 2013.
 20. Auliyah, P. Efek Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella thypi* [Skripsi]. Universitas Taduloka. 2016.
 21. Mambang., Rosidah., dan Dwi Suryanto. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tempe Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 2014. 25(1).
 22. Syahputra, Gita. Resazurin si Indikator Aktivitas Sel. BioTrends. 2015. 6(2).
 23. Setiabudy, R. Farmakologi dan Terapi Edisi 6. Jakarta : FKUI. 2016.
 24. Ruswanto, Mardianingrum R, Novitriani K. Sintesis Dan Studi in Silico Senyawa 3-NitroN³-[(Pyridin-4-YI) Carbonyl] Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis. Chimica et Natura Acta. 2015. 3(2).