

Hubungan Kuantitatif Struktur Senyawa N-(Fenilkarbamotioil)-Benzamida Dan Turunannya Terhadap Aktivitas Anti Tuberkulosis Secara *In Silico*

Luh Adi Kusuma Suardiani^{1*}, Dini Kesuma²

¹Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya

*Email: luhadikusuma@gmail.com

Abstract

In silico study carried out on N-(phenylcarbamothioyl)-benzamide and its derivatives with prediction activity as anti tuberculosis. N- (phenylcarbamothioyl)-benzamide and its derivatives have the same pharmacophore and mechanism of action with Isoniazid which inhibits the enzyme inhA (PDB code: 2NV6). Analyzes the relationship of physicochemical properties (lipophilic, electronic, and steric) of N-(phenylcarbamothioyl)- benzamide and its derivatives to *in silico* prediction of activity, toxicity, and bioavailability as anti tuberculosis was carried out in order to obtain the best equation of quantitativ structure activity relationship (QSAR). The result of anti tuberculosis activity with the best QSAR equation is, Activity = $-2,239 \pi^2 + 6,049 \pi - 2,917 \sigma + 3,267 Es - 78,090$ ($n = 20$; $r = 0,689$; $SE = 5,014$; $F = 3,382$; $Sig. = 0,037$). The result of bioavailability with the best QSAR equation is, Bioavailability = $-0,86 \pi^2 + 0,98 \pi - 2,34 \sigma + 89,78$ ($n = 20$; $r = 0,69$; $SE = 1,05$; $F = 4,80$; $Sig. = 0,01$). The result of toxicity with the best QSAR equation is, Toxicity = $7,25 \pi^2 + 1,09 \pi + 9,59 Es + 2869,36$ ($n = 20$; $r = 0,66$; $SE = 12,70$; $F = 4,16$; $Sig. = 0,02$). The results of this study concluded that anti tuberculosis activity was most influenced by lipophilic properties compared to steric and electronic properties.

Keywords: QSAR; *In Silico*; Anti Tuberculosis; Thiourea.

Abstrak

Penelitian secara *in silico* dilakukan terhadap senyawa N-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya dengan prediksi aktivitas sebagai anti tuberkulosis. Senyawa N-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya memiliki gugus farmakofor dan mekanisme kerja yang sama dengan Isoniazid yaitu menghambat enzim inhA (kode PDB: 2NV6). Analisis hubungan antara struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik, dan sterik) dari senyawa N-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya terhadap aktivitas, bioavailabilitas, dan toksisitas secara *in silico* sebagai anti tuberkulosis dilakukan agar diperoleh persamaan hubungan kuantitatif struktur aktivitas (HKSA) terbaik. Hasil prediksi aktivitas anti tuberkulosis dengan persamaan HKSA terbaik yaitu, Aktivitas = $-2,239 \pi^2 + 6,049 \pi - 2,917 \sigma + 3,267 Es - 78,090$ ($n = 20$; $r = 0,689$; $SE = 5,014$; $F = 3,382$; $Sig. = 0,037$). Hasil prediksi bioavailabilitas dengan persamaan HKSA terbaik yaitu, Bioavailabilitas = $-0,86 \pi^2 + 0,98 \pi - 2,34 \sigma + 89,78$ ($n = 20$; $r = 0,69$; $SE = 1,05$; $F = 4,80$; $Sig. = 0,01$). Hasil prediksi toksisitas dengan persamaan HKSA terbaik yaitu, Toksisitas = $7,25 \pi^2 + 1,09 \pi + 9,59 Es + 2869,36$ ($n = 20$; $r = 0,66$; $SE = 12,70$; $F = 4,16$; $Sig. = 0,02$). Hasil penelitian ini disimpulkan bahwa aktivitas anti tuberkulosis paling dipengaruhi oleh sifat lipofilik dibandingkan sifat sterik dan elektronik.

Kata Kunci: HKSA; *In Silico*; Anti Tuberkulosis; Tiourea.

1. PENDAHULUAN

Proses pengembangan obat baru dimulai dari menemukan senyawa penuntun memerlukan waktu sekitar sepuluh sampai empat belas tahun dengan biaya kurang lebih Rp 12 triliun. Upaya pengembangan obat secara coba-coba (*trial and error*) banyak dilakukan tanpa adanya desain yang memadai sehingga hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan yang diharapkan atau kurang maksimal (Siswodiharjo, 2016).

Upaya yang dilakukan agar pengembangan obat baru dapat dilakukan dengan efisien yaitu dengan pendekatan sistem komputasi dan memanfaatkan sistem informasi untuk membentuk rancangan obat yang rasional yang disebut dengan *in silico*. *In silico* merupakan metode prediksi dengan memasukkan ligan menggunakan program tertentu secara komputerisasi. Metode *in silico* dilakukan dengan *molecular docking* yaitu suatu pemodelan molekul yang digunakan untuk mempelajari sifat molekul obat dan reseptor hingga memahami bagaimana aksi obat pada tingkat molekul dan atom dengan menggunakan simulasi dan prediksi proses interaksi obat–reseptor atau disebut dengan docking dengan bantuan komputer (Siswodiharjo, 2016)

Metode *in silico* melalui *molecular docking* banyak dilakukan untuk mengembangkan obat–obat untuk penyakit kronis, salah satunya obat anti tuberkulosis (Palomino & Martin, 2014). Tuberkulosis atau yang sering disebut dengan TB merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya infeksi dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. TB selain dapat menyerang paru, juga dapat menyerang beberapa organ lain dalam tubuh manusia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2016). *World Health Organization* (WHO) tahun 2015 menyatakan diperkirakan terdapat 9,6 juta kasus TB ditingkat dunia, sedangkan di Indonesia diperkirakan ada sekitar 1 juta kasus TB baru pertahun (Peraturan Menteri Kesehatan No. 67, 2016). Selain itu, *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) di Indonesia cenderung meningkat setiap tahunnya, dimana *Mycobacterium*

tuberculosis resistensi terhadap rifampisin dan isoniazid dengan atau tanpa resistensi terhadap OAT lain (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2016) Kejadian TB yang sangat tinggi dapat disebabkan karena pengobatannya yang lama yaitu sekitar enam bulan menggunakan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) sehingga terdapat pasien yang tidak patuh menggunakan obat. Hal ini dapat meningkatkan resiko *Mycobacterium tuberculosis* menjadi resisten terhadap OAT, salah satunya terhadap (Nugrahaeni & Malik, 2015). Meningkatnya resiko resistensi dari penggunaan OAT sehingga membuat peneliti terus melakukan pengembangan, sintesis dan evaluasi terhadap anti tuberkulosis. Penelitian yang dilakukan oleh Khan bersama timnya pada tahun 2008 ditemukan bahwa urea memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Selain itu mereka juga menemukan bahwa senyawa yang strukturnya mirip dengan urea yaitu tiourea memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan urea (Khan, et al., 2008). Pada tahun 2017, Ghorab dan timnya melakukan sintesis terhadap senyawa *N*-(2,6-dimetoksipirimidin-4-il)-4-(3-(aril)tioureido)-benzenesulfonamida dengan mensubstitusi lima belas substituen sehingga diperoleh dua turunan senyawa yang memiliki aktivitas paling poten sebagai anti tuberkulosis dengan nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) yaitu 4-(3-benzo[1,3]dioksol-5-il tioureido)-*N*-(2,6-dimetoksipirimidin-4-il)-benzenesulfonamida dengan nilai MIC yaitu 3,13 µg/mL dan *N*-(2,6-dimetoksipirimidin-4-il)-4-(3-(4-morfolin-4-il-fenil)tioureido)- benzenesulfonamida dengan nilai MIC yaitu 6,25 µg/mL (Ghorab, et al., 2017)

. Penelitian lain yang dilakukan oleh Dini Kesuma bersama timnya tahun 2018 memprediksi bahwa turunan dari senyawa *N*-(benzoil)-*N'*-feniltiourea yaitu senyawa *N*-(3,4-dimetilbenzoil)-*N'*-feniltiourea memiliki aktivitas sebagai anti kanker (Kesuma, et al., 2018). Pada penelitian ini dilakukan analisis untuk mendapatkan persamaan terbaik hubungan kuantitatif struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik, dan sterik) dari senyawa *N*-

(fenilkarbamotioil)-benzamida (BFKT) dan turunannya terhadap prediksi bioavailabilitas, aktivitas, dan toksisitas secara *in silico* sebagai anti tuberkulosis menggunakan Isoniazid sebagai senyawa pembanding dan enzim inhA (kode PDB: 2NV6) sebagai target biologis. Isoniazid dipilih sebagai senyawa pembanding karena merupakan OAT lini pertama yang paling sering digunakan dan memiliki gugus karbonil dan amin yang juga terdapat dalam senyawa BFKT. Sedangkan enzim inhA dengan kode 2NV6 dipilih karena memiliki ligan yaitu Isonikoinat asil-NAD yang merupakan senyawa hasil metabolisme Isoniazid yang berikatan dengan NAD (Nikotinamida Adenosin Dinukleotida).

2. METODE

a) Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dibutuhkan suatu makromolekul sebagai target biologis yaitu enzim inhA yang diunduh di Protein Data Bank (PDB) dengan link (www.pdb.org) dengan PDB 2NV6 serta struktur dua dimensi dan tiga dimensi dari senyawa BFKT dan turunannya serta Isonikotinat asil-NAD. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu perangkat komputer merek ASUS dengan Intel AMD A10 untuk menginstal program yang dilakukan untuk proses *in silico*. Program *ChemBioDraw Ultra* 12.0.2 untuk menggambar struktur dua dimensi senyawa BFKT dan turunannya. Program *ChemBio3D Ultra* 12.0.2 untuk menggambar struktur tiga dimensi senyawa BFKT dan turunannya. Program *Molegro Virtual Docker* 5.0 untuk *molecular docking*. *Prediction of Activity Spectra for Substances Online* (PASS Online) untuk memprediksi aktivitas biologis awal dari suatu senyawa. *pkCSM* untuk memprediksi bioavailabilitas (ADME) dan sifat fisika kimia berdasarkan Hukum Lima Lipinski. *Prediction of Toxicity* (ProTox) untuk memprediksi toksisitas. Program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 24 untuk analisis statistik.

b) Parameter Uji

Parameter yang diamati dalam penelitian ini yaitu parameter sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik dan sterik), parameter aktivitas, parameter bioavailabilitas, dan parameter toksisitas. Parameter sifat fisika kimia meliputi parameter sifat lipofilik yaitu π dan *Calculated log P* (Clog P), parameter elektronik yaitu σ dan E_{tot} , serta parameter sterik yaitu *Calculated Molar Refractivity* (CMR) dan E_s . Parameter aktivitas ditunjukkan oleh nilai rerank score dan RMSD, parameter bioavailabilitas ditunjukkan oleh nilai *intestinal absorption (human)*, sedangkan parameter toksisitas ditunjukkan oleh nilai LD_{50} .

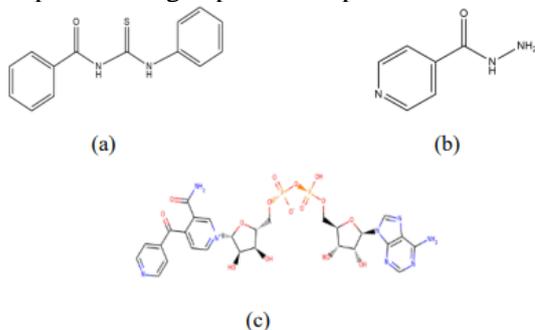
c) Prosedur Kerja

Prosedur kerja dalam penelitian ini dimulai dengan menggambarkan struktur dua dimensi dari senyawa BFKT dan turunannya menggunakan program *ChemBioDraw Ultra* 12.0.2 yang diikuti dengan mencari data sifat fisika kimia dari senyawa BFKT dan turunannya menggunakan program yang sama. Selanjutnya dilakukan prediksi awal untuk mengetahui apakah senyawa BFKT dan turunannya memiliki aktivitas sebagai anti tuberkulosis atau tidak dengan menggunakan PASS Online. Langkah berikutnya, menggambar struktur tiga dimensi senyawa BFKT dan turunannya menggunakan program *ChemBio3D Ultra* 12.0.2 yang diikuti dengan mencari model struktur tiga dimensi yang paling stabil yang dilakukan dengan *Minimize Energy* menggunakan program yang sama. Selanjutnya menginteraksikan senyawa BFKT dan turunannya dengan enzim inhA menggunakan program *Molegro Virtual Docker* 5.0, kemudian mencari data toksisitas senyawa BFKT dan turunannya menggunakan ProTox yang diakses secara online dan mencari data bioavailabilitas senyawa BFKT dan turunannya secara online menggunakan *pkCSM* yang diikuti mencari data sifat fisika kimia berdasarkan Hukum Lima Lipinski menggunakan program yang sama. Setelah semua data parameter uji diperoleh, selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan program statistik SPSS. Program SPSS digunakan untuk mendapatkan persamaan

hubungan kuantitatif struktur aktivitas dari senyawa BFKT dan turunannya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur dari senyawa BFKT sebagai senyawa penuntun atau senyawa induk dan Isoniazid yang dalam bentuk aktifnya yaitu Isonikotinat asil-NAD sebagai senyawa pembanding dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida (a), Isoniazid (b), dan Isonikotinat asil-NAD (c)

Turunan dari senyawa BFKT ditentukan berdasarkan metode pendekatan Topliss dengan memasukkan 26 substituen ke senyawa induk yaitu 4-Cl; 3,4-Cl₂; 4-Cl, 3-CF₃; 4-NO₂, 3-CF₃; 4-CF₃; 4-Br; 4-I; 2,4-Cl₂; 4-NO₂; 4-CH₃; 3-Cl; 3-N(CH₃)₂; 3-CH₃; 2-Cl; 2-CH₃; 2-OCH₃; 4-F; 4-C(CH₃)₃; 3-CF₃; 3,5-Cl₂; 4-OCH₃; 4-N(CH₃)₂; 4-NH₂; 4-OH; 4-OCH(CH₃)₂; 3-CH₃, 4-N(CH₃)₂ (Siswodiharjo, 2016). Dari 26 substituen tersebut hanya 19 yang dipilih, hal itu dikarenakan substituen 4-CH₃; 3-CH₃; 2-CH₃; dan 3-CH₃, 4-N(CH₃)₂ memiliki nilai Es yaitu nol, sedangkan 3-N(CH₃)₂; 4-N(CH₃)₂; dan 4-OCH(CH₃)₂ tidak memiliki nilai Es sehingga hal ini akan mempengaruhi hasil analisis regresi. Jadi substituen yang digunakan yaitu 4-Cl; 3,4-Cl₂; 4-Cl, 3-CF₃; 4-NO₂, 3-CF₃; 4-CF₃; 4-Br; 4-I; 2,4- Cl₂; 4-NO₂; 3-Cl; 2-Cl; 2-OCH₃; 4-F; 4-C(CH₃)₃; 3-CF₃; 3,5-Cl₂; 4-OCH₃; 4-NH₂; 4-OH. Isoniazid dipilih sebagai senyawa pembanding karena merupakan OAT lini pertama yang paling sering digunakan dan memiliki gugus karbonil dan amin yang juga terdapat dalam senyawa BFKT.

Makromolekul yang digunakan sebagai target biologis dari senyawa uji yaitu enzim inhA. Enzim inhA yang dipilih memiliki kode 2NV6 dipilih karena

memiliki ligan yaitu Isonikoinat asil-NAD yang merupakan senyawa hasil metabolisme Isoniazid yang berikatan dengan NAD (Nikotinamida Adenosin Dinukleotida).

3.1. Prediksi Aktivitas

Hasil prediksi aktivitas dari senyawa senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya secara online menggunakan PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) online dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Prediksi Senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan Turunannya

No	Senyawa	Pa	Pi	Aktivitas
1	BFKT	0,648	0,005	Anti tuberkulosis
2	4-Cl-BFKT	0,623	0,005	Anti tuberkulosis
3	3,4-Cl ₂ -BFKT	0,588	0,006	Anti tuberkulosis
4	3-CF ₃ -4-Cl-BFKT	0,458	0,018	Anti tuberkulosis
5	3-CF ₃ -4-NO ₂ -BFKT	0,543	0,009	Anti tuberkulosis
6	4-CF ₃ -BFKT	0,551	0,008	Anti tuberkulosis
7	4-Br-BFKT	0,703	0,004	Anti tuberkulosis
8	4-I-BFKT	0,700	0,004	Anti tuberkulosis
9	2,4-Cl ₂ -BFKT	0,530	0,010	Anti tuberkulosis
10	4-NO ₂ -BFKT	0,755	0,004	Anti tuberkulosis
11	4-NO ₂ -BFKT	0,612	0,005	Anti tuberkulosis
12	2-Cl-BFKT	0,528	0,010	Anti tuberkulosis
13	2-OCH ₃ -BFKT	0,617	0,005	Anti tuberkulosis
14	4-F-BFKT	0,544	0,009	Anti tuberkulosis
15	4-C(CH ₃) ₃ -BFKT	0,564	0,007	Anti tuberkulosis
16	3-CF ₃ -BFKT	0,535	0,009	Anti tuberkulosis
17	3,5-Cl ₂ -BFKT	0,613	0,005	Anti tuberkulosis
18	4-OCH ₃ -BFKT	0,624	0,005	Anti tuberkulosis
19	4-NH ₂ -BFKT	0,720	0,004	Anti tuberkulosis

20	4-OH-BFKT	0,673	0,004	Anti tuberkulosis
----	-----------	-------	-------	-------------------

Keterangan: BFKT= *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida

Dari hasil prediksi aktivitas menggunakan PASS online, senyawa BFKT dan turunannya diprediksi memiliki aktivitas sebagai anti tuberkulosis. Senyawa BFKT dan seluruh turunannya memiliki nilai *Probably to be active* (Pa) > *Probably to be inactive* (Pi).

3.2. Parameter Fisika Kimia

Parameter sifat fisika kimia dapat diperoleh dengan menggunakan beberapa program, antara lain *ChemBioDraw Ultra 12.0.2* dari *CambridgeSoft®* digunakan untuk mendapatkan parameter sifat fisika kimia senyawa yaitu parameter ClogP dan CMR. Program *ChemBio3D Ultra 12.0.2* dari *CambridgeSoft®* digunakan untuk mendapatkan parameter Etot. Parameter sifat fisika kimia lain seperti parameter π Hansch, σ Hammett, dan Es Taft dapat diperoleh dengan menggunakan tabel Hansch. Hasil pencarian parameter sifat fisika kimia senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya dapat dilihat lampiran 1.

3.3. Parameter Bioavailabilitas

pkCSM merupakan program online yang digunakan untuk mendapatkan parameter bioavailabilitas berupa intestinal absorption (human). Hasil penentuan parameter bioavailabilitas dari Isoniazid dan senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya dapat dilihat pada lampiran 2.

Bioavailabilitas merupakan suatu pengukuran laju dan jumlah obat yang aktif terapan yang mencapai sirkulasi sistemik (Shargel, et al., 2012). pkCSM merupakan program online yang digunakan untuk mendapatkan parameter bioavailabilitas berupa *intestinal absorption (human)*. Dari hasil analisis diperoleh bahwa nilai *intestinal absorption (human)* tertinggi ditunjukkan oleh senyawa 4-OH-BFKT yaitu 91,31%. Sedangkan Isoniazid memiliki nilai yang lebih rendah yaitu 75,65%, dimana senyawa BFKT dan semua turunannya memiliki nilai *intestinal*

absorption (human) lebih besar dibandingkan Isoniazid. Jadi senyawa BFKT dan turunannya diprediksi memiliki bioavailabilitas lebih besar dibandingkan Isoniazid.

3.4. Parameter Aktivitas

Dalam proses *molecular docking* dapat digunakan suatu program yaitu *Molegro Virtual Docker* atau yang disingkat MVD. Beberapa parameter yang menggambarkan aktivitas dari senyawa uji dapat diperoleh dari program MVD yaitu *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Hbond*, *Moldock Score*, dan *Rerank Score* (*Molegro Virtual Docker*, 2008). Parameter aktivitas yang ditunjukkan dengan nilai *Rerank Score* senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya dan Isonicotinat asil-NAD dapat dilihat pada lampiran 3.

Moldock Score menggambarkan skor energi yang digunakan selama proses *docking*. *Rerank Score* merupakan suatu parameter yang menunjukkan energiyang didapat setelah dilakukan perankingan kembali. RMSD merupakan indikator reliabilitas. *Hbond* merupakan energi ikatan hidrogen antara protein dan ligan. Dalam hal ini *Rerank Score* dan RMSD digunakan untuk menggambarkan parameter aktivitas dikarenakan *Rerank Score* merupakan parameter *scoring* yang faktor kesalahannya sudah diminimalkan. Sedangkan RMSD menggambarkan reliabilitas dari hasil yang diperoleh (Wenas, 2015).

Pada penelitian ini diperoleh nilai RMSD yaitu 1,80Å, dimana jika nilai RMSD kurang dari 2Å maka proses *docking* memiliki reliabilitas baik dan validitas yang tinggi sehingga suatu senyawa dapat dipercaya memiliki aktivitas biologis tertentu. Jadi hasil dari proses *docking* memiliki reliabilitas dan validitas yang baik. Sedangkan nilai *Rerank Score* yang terbaik atau terendah didapatkan dari senyawa 3-CF3-4-NO2-BFKT dengan nilai *Rerank Score* -89,69 kkal/mol dibandingkan dengan senyawa pembanding yaitu Isonicotinat asil-NAD dengan nilai *Rerank Score* -142,69

kkal/mol. Semakin rendah nilai *Rerank Score* menunjukkan aktivitas biologis yang dihasilkan semakin baik dikarenakan energi yang dibutuhkan oleh senyawa untuk berikatan dengan enzim inhA semakin

3.5. Parameter Toksisitas

Parameter LD₅₀ dapat diperoleh dengan menggunakan program *online* yaitu ProTox. Semakin kecil nilai LD₅₀ yang diperoleh maka senyawa tersebut semakin toksik. Parameter toksisitas dari senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya dan Isoniazid dapat dilihat pada lampiran 4.

Definisi dari masing-masing kelas toksisitas yaitu: Kelas 1 : fatal jika tertelan (LD₅₀ ≤ 5 mg/kg). Kelas 2 : fatal jika tertelan (5 < LD₅₀ ≤ 50 mg/kg). Kelas 3 : toksik jika tertelan (50 < LD₅₀ ≤ 300 mg/kg). Kelas 4 : berbahaya jika tertelan (300 < LD₅₀ ≤ 2000 mg/kg). Kelas 5 : kemungkinan berbahaya jika tertelan (2000 < LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg). Kelas 6 : tidak toksik (LD₅₀ > 5000 mg/kg) (Drwal *et al.*, 2014).

Parameter toksisitas ditunjukkan dengan nilai LD₅₀ atau *Lethal dose* 50 yang berarti suatu nilai yang menunjukkan besarnya dosis yang dapat menyebabkan setengah atau 50% dari hewan uji mati (Gatne, *et al.*, 2015). Parameter LD₅₀ dapat diperoleh dengan menggunakan program *online* yaitu ProTox. Semakin kecil nilai LD₅₀ yang diperoleh maka senyawa tersebut semakin toksik (Gatne, *et al.*, 2015). Dari hasil analisis diperoleh bahwa senyawa BFKT dan 14 turunannya memiliki nilai LD₅₀ yaitu 2885 mg/kg dan 5 turunan lainnya memiliki nilai LD₅₀ yaitu 2850 mg/kg serta berada di kelas 5. Sedangkan Isoniazid memiliki nilai LD₅₀ sebesar 133 mg/kg dengan kelas toksisitas yaitu kelas 6. Dimana kelas 5 menunjukkan suatu senyawa kemungkinan berbahaya jika tertelan, sedangkan kelas 3 menunjukkan toksik jika tertelan. Jadi senyawa BFKT dan turunannya diprediksi lebih aman dibandingkan Isoniazid.

3.6. Interaksi Senyawa dengan Makromolekul

Ikatan senyawa dengan asam amino dari enzim inhA dapat diperoleh dengan menggunakan *Molegro Virtual Docker*. Interaksi antara senyawa dengan asam amino reseptor akan ditampilkan menjadi menjadi 3 bagian yaitu ikatan hidrogen, interaksi elektrostatis, dan interaksi sterik. Hasil interaksi senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya dan Isoniazid dengan enzim inhA dapat dilihat pada lampiran 5.

Ikatan senyawa dengan makromolekul terjadi ketika senyawa yang berperan sebagai ligan berikatan dengan asam amino yang menyusun enzim inhA. Ikatan kimia yang terlibat dalam proses *docking* senyawa BFKT beserta turunannya dan Isonicotinat asil-NAD dengan enzim inhA pada penelitian ini adalah ikatan hidrogen dan interaksi sterik tanpa adanya interaksi elektrostatis. Ikatan hidrogen dan sterik memiliki pengaruh besar terhadap ikatan senyawa BFKT dan turunannya dengan asam amino pada enzim inhA. Semakin banyak jumlah ikatan hidrogen dan ikatan sterik antara senyawa uji dan enzim inhA, maka diprediksi ikatan antara senyawa uji dan enzim inhA semakin stabil.

Pada penelitian ini, ikatan hidrogen yang terlibat dalam interaksi antara senyawa BFKT dan turunannya dengan enzim inhA lebih sedikit dibandingkan antara Isonicotinat asil-NAD dengan enzim inhA yaitu hanya Ile194. Sedangkan ikatan hidrogen yang terlibat dalam interaksi Isonicotinat asil-NAD dengan enzim inhA yaitu Lys165, Ile21, Ile95, Ile194, Ser20, Met147, Gly14, Gly96, Val65, Asp64.

Asam amino yang terlibat dalam interaksi sterik antara enzim inhA dengan senyawa BFKT dan beberapa turunannya lebih banyak dibandingkan dengan Isonicotinat asil-NAD dengan enzim inhA. Didapatkan enam jumlah ikatan asam amino paling banyak yang terlibat antara interaksi senyawa uji dengan enzim inhA melalui interaksi sterik yaitu pada senyawa 3,4-Cl₂-BFKT dan 3-CF₃-4-Cl-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194,

Pro193, Phe149, Lys165, Asp148, Ala191; 3-CF₃-4-NO₂-BFKT mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Asp148, Ala191, Gly192; 4-CF₃-BFKT dan 4-C(CH₃)₃-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Lys165, Asp148, Met147; dan 4-NO₂-BFKT mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Lys165, Asp148, Tyr158.

Selain itu, terdapat tujuh senyawa uji yang mengikat lima jenis asam amino melalui interaksi sterik yaitu 4-Cl-BFKT, 4-Br-BFKT, 4-I-BFKT, dan 4-OCH₃-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Lys165, Asp148. 3-Cl-BFKT, 3-CF₃-BFKT, dan 3,5-Cl₂-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Asp148, Ala191.

Terdapat lima senyawa uji yang mengikat empat jenis asam amino melalui interaksi sterik yaitu BFKT yang mengikat Ile194, Pro193, Phe149, dan Tyr158. 2,4-Cl₂-BFKT dan 4-OH-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Lys165, 2-OCH₃-BFKT mengikat Ile194, Phe149, Gly192, Ala191. 4-F-BFKT yang mengikat Ile194, Pro193, Phe149, Asp148. Terdapat dua senyawa uji yang mengikat tiga jenis asam amino melalui interaksi sterik yaitu 2-Cl-BFKT dan 4-NH₂-BFKT yang sama-sama mengikat Ile194, Pro193, Phe149.

Jumlah asam amino yang terlibat dalam interaksi sterik antara Isonikotinat asil-NAD dengan enzim inhA yaitu empat jenis asam amino, diantaranya Ile194, Gly14, Asp148, Ala191. Jenis asam amino yang terlibat dalam interaksi antara senyawa BFKT dan turunannya dengan enzim inhA tidak jauh berbeda dengan jenis asam amino yang terlibat dalam interaksi antara Isonikotinat asil-NAD dengan enzim inhA, dimana senyawa BFKT beserta turunannya dan Isonikotinat asil-NAD sama-sama mengikat Ala191, Asp148, Ile194, Lys165, dan Met147 sehingga senyawa BFKT dan turunannya diprediksi memiliki mekanisme anti tuberkulosis yang mirip dengan Isoniazid yang dalam

bentuk aktifnya yaitu Isonikotinat asil-NAD terhadap enzim inhA.

3.7. Analisis Hukum Lima Lipinski

Proses *molecular docking* tidak melibatkan parameter lipofilik. Untuk mendapatkan parameter lipofilik dilakukan analisis menggunakan Hukum Lima Lipinski (Siswodiharjo, 2016). Hasil analisis sifat fisika kimia menurut Hukum Lima Lipinski dari senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya dan Isonikotinat asil-NAD dapat dilihat pada lampiran 6.

Proses *docking* menggambarkan bahwa suatu obat atau senyawa sudah masuk ke sistemik dan akan berikatan dengan target biologisnya. Dalam proses *docking* hanya melibatkan dua parameter fisika kimia yaitu elektronik dan sterik tanpa melibatkan parameter lipofilik. Hal itu dikarenakan parameter lipofilik mempengaruhi proses penembusan membran sebelum obat atau senyawa masuk ke sistemik. Maka dari itu, parameter lipofilik dianalisis menggunakan Hukum Lima Lipinski yang menyatakan bahwa senyawa akan sulit diabsorpsi dan permeabilitasnya rendah apabila berat molekulnya lebih besar dari 500; mempunyai nilai log koefisien partisi oktanol/air (log P) lebih besar +5; mempunyai ikatan-H donor yang dinyatakan dengan jumlah gugus O-H dan N-H lebih besar 5; mempunyai ikatan-H aseptor yang dinyatakan dengan jumlah atom O dan N lebih besar 10 (Siswodiharjo, 2016).

Dari hasil analisis parameter lipofilik menurut Hukum Lima Lipinski menggunakan pkCSM, dimana senyawa BFKT beserta turunannya memenuhi semua ketentuan. Maka dari itu, dapat diprediksi bahwa senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida beserta turunannya memiliki kemampuan menembus membran yang baik sehingga absorpsinya juga baik.

3.8. Correlation Matrix

Setelah mendapatkan semua data dari parameter uji, kemudian data tersebut diolah menggunakan program analisis statistik yaitu *IBM®SPSS®*

untuk menguji hipotesa penelitian melalui hubungan korelasi yang disebut dengan *Correlation Matrix*. Hasil *correlation matrix* senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya dapat dilihat pada lampiran 7.

Uji korelasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu *correlation matrix* untuk menganalisis adanya hubungan linier antara variabel bebas dan variabel terikat. Hasil dari uji korelasi menggunakan *correlation matrix* dapat bernilai positif atau negatif. Hasil korelasi bernilai positif berarti bahwa hubungan antara variabel penelitian tersebut searah, dimana apabila variabel bebas memiliki nilai yang besar maka variabel terikat juga akan memiliki nilai yang besar. Sedangkan hasil korelasi bernilai negatif berarti bahwa hubungan antara variabel penelitian tersebut berlawanan, dimana apabila variabel bebas memiliki nilai yang besar maka variabel terikat akan memiliki nilai yang kecil dan demikian sebaliknya (Pramesti, 2015).

Hasil analisis data dengan uji korelasi didapat bahwa σ berpengaruh secara signifikan pada $p \leq 0,05$ terhadap bioavailabilitas dengan nilai korelasi *Pearson* sebesar - 0,528 dan nilai signifikansi 0,017. *Es* berpengaruh secara signifikan pada $p \leq 0,05$ terhadap aktivitas anti tuberkulosis dengan nilai korelasi *Pearson* sebesar 0,474 dan nilai signifikansi 0,035. *Es* berpengaruh secara signifikan pada $p \leq 0,05$ terhadap toksisitas dengan nilai korelasi *Pearson* sebesar 0,452 dan nilai signifikansi 0,045.

3.9. Analisis Regresi

Setelah dilakukannya analisis data dengan uji korelasi, maka proses analisis dilanjutkan dengan melakukan analisis regresi. Analisis regresi dilakukan terhadap semua parameter uji dengan menggunakan satu parameter, dua parameter, dan tiga parameter.

Analisis regresi yang pertama dilakukan yaitu antara parameter fisika kimia terhadap parameter aktivitas anti

tuberkulosis. Dari hasil analisis regresi diperoleh dua puluh dua persamaan, namun tidak semua persamaan menunjukkan hasil yang signifikan. Untuk hasil analisis regresi satu parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik yaitu *Es* memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas} = 2,955 E_s - 77,340 \\ (n = 20; r = 0,474; SE = 5,558; F = 5,215; \text{Sig.} = 0,034)$$

Dari persamaan linier tersebut, aktivitas anti tuberkulosis dipengaruhi oleh parameter sterik (*Es*). Nilai dari parameter sterik (*Es*) searah dengan aktivitas anti tuberkulosis, dimana semakin besar nilai parameter sterik (*Es*) maka aktivitas anti tuberkulosis yang dihasilkan juga semakin besar.

Hasil analisis regresi dua parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter sterik (*Es*) memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas} = -1,470 \pi^2 + 4,873 \pi + 3,924 E_s - 78,786 \\ (n = 20; r = 0,676; SE = 4,935; F = 4,480; \text{Sig.} = 0,018)$$

Dari persamaan non linier tersebut, aktivitas anti tuberkulosis lebih besar dipengaruhi oleh parameter lipofilik (π) kemudian diikuti secara berurutan oleh parameter sterik (*Es*) dan parameter lipofilik (π^2). Hal ini dikarenakan nilai parameter lipofilik (π) lebih besar dibandingkan parameter sterik (*Es*) dan parameter lipofilik (π^2). Nilai dari parameter lipofilik (π) dan parameter sterik (*Es*) searah dengan aktivitas anti tuberkulosis, dimana semakin besar nilai parameter lipofilik (π) dan parameter sterik (*Es*) maka aktivitas anti tuberkulosis yang dihasilkan akan semakin besar. Sedangkan nilai dari parameter lipofilik (π^2) berlawanan dengan aktivitas anti tuberkulosis, dimana semakin rendah nilai dari parameter lipofilik (π^2) maka aktivitas anti tuberkulosis akan semakin besar.

Hasil analisis regresi tiga parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik (π dan π^2), parameter elektronik (σ), dan parameter sterik (*Es*) memberikan hasil

yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas} = -2,239 \pi^2 + 6,049 \pi - 2,917 \sigma + 3,267 \text{Es} - 78,090$$

$$(n = 20; r = 0,689; SE = 5,014; F = 3,382; \text{Sig.} = 0,037)$$

Dari persamaan non linier tersebut, aktivitas anti tuberkulosis lebih besar dipengaruhi oleh parameter lipofilik (π) kemudian diikuti secara berurutan oleh parameter sterik (Es), parameter elektronik (σ), dan parameter lipofilik (π^2). Hal ini dikarenakan nilai parameter lipofilik (π) lebih besar dibandingkan dengan parameter sterik (Es), parameter elektronik (σ), dan parameter lipofilik (π^2). Nilai dari parameter lipofilik (π) dan parameter sterik (Es) searah dengan aktivitas anti tuberkulosis, dimana semakin besar nilai parameter lipofilik (π) dan parameter sterik (Es) maka aktivitas anti tuberkulosis yang dihasilkan akan semakin besar. Sedangkan nilai dari parameter elektronik (σ) dan parameter lipofilik (π^2) berlawanan dengan aktivitas, dimana semakin rendah nilai parameter elektronik (σ) dan parameter lipofilik (π^2) maka aktivitas anti tuberkulosis yang dihasilkan akan semakin besar.

Setelah diperoleh persamaan HKSA terbaik dari satu, dua, dan tiga parameter maka disimpulkan bahwa persamaan HKSA terbaik diperoleh dari adanya pengaruh tiga parameter. Pemilihan persamaan HKSA terbaik didasarkan karena persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi $\leq 0,05$ serta nilai r yang paling mendekati 1. Jadi untuk mendapatkan aktivitas anti tuberkulosis yang optimal perlu memperhatikan parameter lipofilik (π), parameter sterik (Es), parameter elektronik (σ), dan parameter lipofilik (π^2).

Setelah dilakukan analisis antara parameter fisika kimia terhadap parameter aktivitas anti tuberkulosis, maka selanjutnya dilakukan analisis antara parameter fisika kimia terhadap parameter bioavailabilitas. Dari hasil analisis regresi diperoleh dua puluh dua persamaan, namun tidak semua persamaan menunjukkan hasil yang

signifikan. Untuk hasil analisis regresi satu parameter diperoleh bahwa parameter elektronik yaitu σ memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$\text{Bioavailabilitas} = -1,548 \sigma + 89,348$$

$$(n = 20; r = 0,528; SE = 1,162; F = 6,966; \text{Sig.} = 0,017)$$

Dari persamaan linier tersebut, bioavailabilitas dipengaruhi oleh parameter elektronik (σ). Nilai dari parameter elektronik (σ) berlawanan dengan bioavailabilitas, dimana semakin rendah nilai parameter elektronik (σ) maka bioavailabilitas yang dihasilkan akan semakin besar. Hasil analisis regresi dua parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter elektronik (σ) memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$\text{Bioavailabilitas} = -0,867 \pi^2 + 0,985 \pi - 2,379 \sigma + 89,788$$

$$(n = 20; r = 0,688; SE = 1,054; F = 4,794; \text{Sig.} = 0,014)$$

Dari persamaan non linier tersebut, bioavailabilitas lebih besar dipengaruhi oleh parameter elektronik (σ), kemudian diikuti secara berurutan oleh parameter lipofilik (π) dan parameter lipofilik (π^2). Hal ini dikarenakan nilai elektronik (σ), lebih besar dibandingkan parameter lipofilik (π) dan parameter lipofilik (π^2). Nilai dari parameter elektronik (σ) dan parameter lipofilik (π^2) berlawanan dengan bioavailabilitas, dimana semakin rendah nilai parameter elektronik σ dan parameter lipofilik (π^2) maka bioavailabilitas yang dihasilkan akan semakin besar. Sedangkan nilai dari parameter lipofilik (π) searah dengan bioavailabilitas, dimana semakin besar nilai parameter lipofilik (π) maka bioavailabilitas yang dihasilkan akan semakin besar.

Hasil analisis regresi tiga parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik (π dan π^2), parameter elektronik (σ), dan parameter sterik (Es) memberikan hasil yang signifikan

yang dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$\text{Bioavailabilitas} = -0,996 \pi^2 + 1,092 \pi - 2,806 \sigma - 0,272 E_s + 89,932$$

(n = 20; r = 0,704; SE = 1,064; F = 3,692; Sig. = 0,028)

Dari persamaan non linier tersebut, bioavailabilitas lebih besar dipengaruhi oleh parameter elektronik (σ), kemudian diikuti secara berurutan oleh parameter lipofilik (π), parameter lipofilik (π^2), dan parameter sterik (E_s). Hal ini dikarenakan nilai parameter elektronik (σ) lebih besar dibandingkan parameter lipofilik (π), parameter lipofilik (π^2), dan parameter sterik (E_s). Nilai dari parameter elektronik (σ) dan parameter sterik (E_s) berlawanan dengan bioavailabilitas, dimana semakin rendah nilai parameter elektronik (σ) dan parameter sterik (E_s) maka bioavailabilitas yang dihasilkan akan semakin besar. Sedangkan nilai dari parameter lipofilik (π dan π^2) searah dengan bioavailabilitas, dimana semakin besar nilai parameter lipofilik (π dan π^2) maka bioavailabilitas yang dihasilkan akan semakin besar.

Setelah diperoleh persamaan HKSA terbaik dari satu, dua, dan tiga parameter maka disimpulkan bahwa persamaan HKSA terbaik diperoleh dari adanya pengaruh tiga parameter. Pemilihan persamaan HKSA terbaik didasarkan karena persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi $\leq 0,05$ serta nilai r yang paling mendekati 1. Jadi untuk mendapatkan bioavailabilitas yang optimal perlu memperhatikan parameter lipofilik (π dan π^2), parameter elektronik (σ), dan parameter sterik (E_s).

Parameter yang selanjutnya dianalisis yaitu antara parameter fisika kimia terhadap parameter toksisitas. Dari hasil analisis regresi diperoleh dua puluh dua persamaan, namun tidak semua persamaan menunjukkan hasil yang signifikan. Untuk hasil analisis regresi satu parameter diperoleh bahwa parameter sterik yaitu E_s memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$\text{Toksitas} = 7,134 E_s + 2876,749$$

(n = 20; r = 0,452; SE = 14,249; F = 4,624; Sig. = 0,045)

Dari persamaan linier tersebut, toksisitas dipengaruhi oleh parameter sterik (E_s). Nilai dari parameter sterik (E_s) searah dengan toksisitas, dimana semakin besar nilai parameter sterik (E_s) maka toksisitas yang dihasilkan akan semakin besar.

Hasil analisis regresi dua parameter diperoleh bahwa parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter sterik (E_s) memberikan hasil yang signifikan yang dinyatakan dalam persamaan berikut :

$$\text{Toksitas} = 7,253 \pi^2 + 1,092 \pi + 9,589 E_s + 2869,360$$

(n = 20; r = 0,662; SE = 12,704; F = 4,155; Sig. = 0,024)

Dari persamaan non linier tersebut, toksisitas lebih besar dipengaruhi oleh parameter sterik (E_s), kemudian diikuti secara berurutan oleh parameter lipofilik (π^2) dan parameter lipofilik (π). Hal ini dikarenakan nilai parameter sterik (E_s) lebih besar dibandingkan parameter lipofilik (π^2) dan parameter lipofilik (π). Nilai dari parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter sterik (E_s) searah dengan toksisitas, dimana semakin besar nilai parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter sterik (E_s) maka toksisitas yang dihasilkan akan semakin besar. Sedangkan hasil analisis regresi tiga parameter diperoleh bahwa tidak terdapat persamaan yang menunjukkan hasil yang signifikan.

Setelah diperoleh persamaan HKSA terbaik dari satu, dua, dan tiga parameter maka disimpulkan bahwa persamaan HKSA terbaik diperoleh dari adanya pengaruh dua parameter. Pemilihan persamaan HKSA terbaik didasarkan karena persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi $\leq 0,05$ serta nilai r yang paling mendekati 1. Jadi untuk mendapatkan toksisitas terendah perlu memperhatikan parameter lipofilik (π dan π^2) dan parameter sterik (E_s).

Setelah proses analisis data dilakukan, maka diperoleh bahwa sifat lipofilik paling mempengaruhi aktivitas anti tuberkulosis terhadap enzim inhA

pada sel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* kemudian diikuti oleh sifat sterik dan elektronik untuk pengembangan obat selanjutnya dari senyawa BFKT. Semakin besar sifat lipofilik dan sifat sterik serta semakin rendah sifat elektronik dari substituen yang disubstitusikan pada benzamida, maka akan diperoleh aktivitas antituberkulosis yang optimal, tetapi tetap harus memperhatikan pengaruhnya terhadap bioavailabilitas dan toksisitasnya.

Meskipun Isoniazid yang dalam bentuk aktifnya Isonikotinat asil-NAD memiliki aktivitas anti tuberkulosis yang lebih besar dan tidak toksik dibandingkan BFKT dan turunannya, sudah banyak terdapat kasus *Mycobacterium tuberculosis* yang mengalami resistensi terhadap Isoniazid. Maka dari itu, untuk mengurangi resiko resistensi perlu dikembangkan senyawa baru untuk dijadikan obat anti tuberkulosis.

4. KESIMPULAN

Ada hubungan non linier struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik, dan sterik) dari senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya terhadap prediksi aktivitas secara *in silico* sebagai anti tuberkulosis yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas} = -2,239 \pi^2 + 6,049 \pi - 2,917 \sigma + 3,267 \text{Es} - 78,090$$

(n = 20; r = 0,689; SE = 5,014; F = 3,382; Sig. = 0,037)

Ada hubungan non linier struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik, dan sterik) dari senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya terhadap prediksi bioavailabilitas secara *in silico* sebagai anti tuberkulosis yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Bioavailabilitas} = -0,996 \pi^2 + 1,092 \pi - 2,806 \sigma - 0,272 \text{Es} + 89,932$$

(n = 20; r = 0,704; SE = 1,064; F = 3,692; Sig. = 0,028)

Ada hubungan non linier struktur, sifat fisika kimia (lipofilik, elektronik, dan sterik) dari senyawa *N*-(fenilkarbamotioil)-benzamida dan turunannya terhadap prediksi toksisitas secara *in silico* sebagai

anti tuberkulosis yang dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\text{Toksitas} = 7,253 \pi^2 + 1,092 \pi + 9,589 \text{Es} + 2869,360$$

(n = 20; r = 0,662; SE = 12,704; F = 4,155; Sig. = 0,024)

REFERENSI

- Gatne, M., Chaudhary, A. & Ravikanth, K., 2015. Acute oral toxicity study of polyherbal formulation AV/KPC/10. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, pp. 281-283.
- Ghorab, M. M. et al., 2017. Synthesis, Docking Study and Biological Evaluation of Some New Thiourea Derivatives Bearing Benzenesulfonamide Moiety. *Chem Cent J*.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2016. *Tuberkulosis: Temukan TB Obati Sampai Sembuh*. [Online] Available at: <https://www.kemkes.go.id/id/rilis-kesehatan/toss-tb-temukan-tb-obati-sampai-sembuh>
- Kesuma, D., Siswandono, Purwanto, B. T. & Hardjono, S., 2018. Uji in silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan *N*-(Benzoil)-*N'*- feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 3(1).
- Khan, S. A., Singh, N. & Saleem, K., 2008. Synthesis, Characterization and In Vitro Antibacterial Activity of Thiourea and Urea Derivatives of Steroids.. *Eur J Med Chem*, 43(10).
- Nugrahaeni, D. K. & Malik, U. S., 2015. Analisis Penyebab Resistensi Obat Anti Tuberkulosis. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 11(1), pp. 8-15.
- Palomino, J. C. & Martin, A., 2014. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. 3(3), pp. 317-340.

- Pramesti, G., 2015. *Kupas tuntas data penelitian dengan SPSS 22*. s.l.:Elex Media Komputindo.
- Shargel, L., Pong, S. W. & Yu, A. B., 2012. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 5th ed. s.l.:s.n.
- Siswodiharjo, S., 2016. *Kimia Medisinal 1*. Surabaya: Airlangga University.
- Wenas, M. A., 2015. Studi HKSA Turunan Benzoiltiourea Secara In Silico Sebagai Calon Obat Sedatif Hipnotik. *Calyptra : Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 4(1).