

MOLECULAR DOCKING
EMPAT TURUNAN ISONICOTINOHYDRAZIDE PADA MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS ENOYL-ACYL CARRIER PROTEIN REDUCTASE (InhA)

Ruswanto

Program Studi Farmasi STIKes Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya
Email : ruzhone@gmail.co

ABSTRAK

Mycobacterium tuberculosis enoil-ACP reduktase (InhA) adalah target yang menarik untuk pengembangan obat baru terhadap TBC. InhA adalah target pertama obat isoniazid untuk pengobatan infeksi tuberkulosis. Senyawa yang secara langsung bekerja pada InhA, tidak memerlukan aktivasi oleh mikobakteri katalase-peroksidase katG adalah kandidat yang menjanjikan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh strain yang resisten terhadap isoniazid (Luckner, 2010). Baru-baru ini, telah dilakukan studi interaksidan toksisitas beberapa senyawa turunan isoniazid (*isonicotinohydrazide*) dengan InhA dengan metode *molecular docking*. Semua senyawa di-docking-an menggunakan aplikasi *ArgusLab 4.0.1*. Proses *docking* yang dilakukan dengan memilih metode *ArgusDock*. Validasi *docking* dengan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) yang diperoleh 1,9457. Analisis hasil *docking* menunjukkan bahwa senyawa 2,5-Dimethyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid N'-(pyridine-4-carbonyl)-hydrazide (senyawa **4**) dapat diprediksi memiliki interaksi yang paling baik daripada senyawa pembanding isoniazid. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa (**4**) memiliki aktivitas penghambatan terhadap reseptor InhA. Hasil uji toksisitas menggunakan program ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*) **semua** senyawa turunan *isonicotinohydrazide* memiliki nilai LC₅₀ dan EC₅₀ > 100 mg/ L sehingga termasuk dalam kategori rendah karena > 100 mg/ L.

Kata kunci : Docking, isoniazid, InhA, toksisitas.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis menjadi penyakit yang sangat diperhitungkan saat meningkatnya angka kematian penduduk terutama di negara berkembang. Diperkirakan sepertiga populasi dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, organisme penyebab tuberkulosis. Dari seluruh kasus tuberkulosis, sebesar 11% dialami oleh anak-anak di bawah 15 tahun.

Dalam lingkup nasional, pada tahun 2004 ada 539.000 kasus baru dan kematian 101 per 100.000 penduduk. Dari laporan WHO tahun 2005 dinyatakan bahwa estimasi insiden TB paru di indonesia dengan dasar hasil pemeriksaan dahak 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, 2013)

Survey yang dilakukan WHO tahun 2007 menunjukkan adanya 92 juta kasus baru dan 1,8 jiwa diantaranya meninggal dunia. Indonesia menduduki peringkat

ketiga didunia setelah Cina dan India dalam jumlah kasus TB. (Barker, 2009)

Resistensi 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).

Penemuan isoniazid adalah tonggak utama dalam kemoterapi tuberkulosis , tetapi perkembangan resistensi terhadap isoniazid (InhA) telah menghambat dalam penggunaannya yang luas dan potensi terapeutiknya. Kebutuhan untuk mengatasi perlawanannya di InhA telah ditemukan berhubungan dengan lima gen yang berbeda katG , InhA , ahpC , Kasa dan NDH, hal ini yang menyebabkan munculnya penelitian-penelitian yang modifikasi struktur isoniazid sehingga diharapkan akan meningkatkan aktivitasnya dan mengurangi resistensi yang ada (Vinšová, 2008; Schroeder,

2002; Scior, 2006; Bernardes, 2013; Judge, 2012).

Malhotra et all (2011) juga telah mensintesis dan mengevaluasi beberapa derivat baru dari 2-propoxybenzylideneisonicotinohydrazide sebagai senyawa anti bakteri. Senyawa 2-propoxybenzylideneisonicotinohydrazide dibuat dengan mereaksikan isoniazid dengan 2-propoxybenzaldehyde menggunakan pelarut etanol. Evaluasi senyawa dilakukan menggunakan metode elemental dan spektral (IR, H-NMR, C-NMR). Dari sepuluh senyawa yang disintesis, diperoleh dua senyawa (senyawa yang mempunyai gugus diethylamino dan methylpiperazine) yang sangat aktif menghambat aktifitas mikrobakteri dan senyawa ini juga memperlihatkan sitotoksis dengan nilai konsentrasi IC-50 mulai dari 2,84-8,55 dan 0,007-0,030 mM.

Menariknya, banyak penelitian yang menunjukkan bahwa anti kegiatan mikrobakteri dari InhA dapat ditingkatkan terhadap *M. tuberkulosis* serta *M. avium complex* dengan menambah INH hidrofilik dengan rantai samping hidrofobik/lipofilik (Rastogi, 1990, 1988; Singh 2011).

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari interaksi senyawa isoniazid yang dimodifikasi dengan urea, tiourea, tiazol ataupun pirazol (Castagnolo , 2008; Mantegazza, 2011; Brown, 2011) dimana senyawa-senyawa ini telah banyak diteliti mempunyai aktivitas penghambatan pada *M. tuberculosis* sehingga akan dihasilkan senyawa turunan isoniazid yang diharapkan akan meningkatkan aktivitasnya dalam menghambat *M. tuberculosis* CNTC 331/88 (*H37Rv*) yang dapat digunakan sebagai kandidat obat anti tuberkulosis yang poten. Dengan penambahan gugus yang dapat menurunkan dan meningkatkan sifat hidrofil maka kita dapat melihat pengaruhnya pada penghambatan pada pada *M. tuberculosis* CNTC 331/88 (*H37Rv*). Dimana Gugus hidrofil ini berhubungan dengan kelarutan senyawa dalam cairan luar sel yang berhubungan dengan proses transpor obat ke tempat aksi atau reseptor.

Tujuan dari penelitian yang telah peneliti lakukan mempelajari interaksi empat turunan *isonicotinohydrazide* (**1**-*isonicotinoylsemicarbazine* (senyawa **1**), *1-isonicotinoylthiosemicarbazine* (senyawa **2**), *N'-(1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carbonyl)isonicotinohydrazide* (senyawa **3**), dan *N'-(1,2,3-thiadiazole-4-carbonyl)isonicotinohydrazide* (senyawa **4**) pada *Mycobacterium Tuberculosis* Enoyl-Acyl carrier Protein Reductase (InhA) dan mempelajari toksitas secara *in silico*.

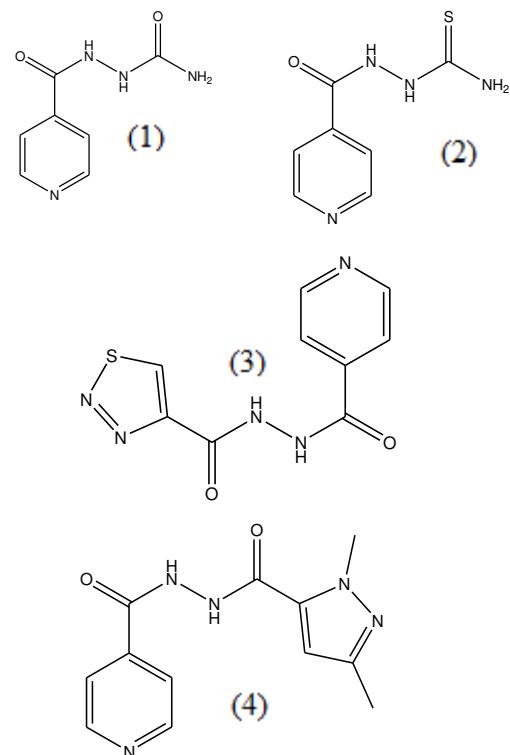
METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa perangkat keras dan lunak komputer. Perangkat tersebut berupa Laptop Acer Aspire E1-471 dengan spesifikasi Intel® Core i3 dengan spesifikasi processor @ 2,3 GHz, 4MB RAM dan perangkat lunak seperti, *argusLab*, MarvinSketch versi 5.2, Chemoffice, MMV, dan ECOSAR.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu reseptor InhA (kode : 2X23) dan *native ligand* (5-hexyl-2-(2-methylphenoxy)phenol) dan empat struktur senyawa berikut ini :



Gambar 1. Turunan *Isonicotinohydrazide* (Chemdraw ultra 8.0)

Studi *In Silico*

Studi *In Silico* senyawa Turunan *isonicotino hydrazide* terhadap InhA dilakukan dengan beberapa tahap.

Preparasi Ligan (Senyawa Turunan *isonicotinohydrazide*)

Ligan digambar dengan menggunakan *software marvin sketch 5.2* kemudian dilakukan optimasi geometri dan protonasi pada pH 7,4. Selanjutnya disimpan dengan format .mrw. Setelah itu dilakukan *Conformational search* dan *save as file* dalam bentuk pdb dan mol2.

Docking dengan ArgusLab

Reseptor tuberkulosis di *download* dari *Protein Data Bank* (PDB). *Docking* dilakukan dengan menggunakan *software ArgusLab*. Hasil docking kemudian dipilih hasil yang memiliki nilai *binding affinity* yang rendah dan disimpan dengan format pdb.

Validasi Metode Docking

Validasi metode *docking* dilakukan dengan *software ArgusLab*. Validasi ini dilakukan terhadap ligan *valid* dan hasil *docking*. Parameter yang digunakan yaitu parameter *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Metode *docking* dikatakan valid jika memiliki nilai RMSD ≤ 2 .

Analisis Hasil Docking

Reseptor dan ligan yang telah di *docking*-kan kemudian diubah menjadi bentuk pdb lalu dianalisis menggunakan *software Molegro Molecular Viewer* (MMV) dengan dilihat interaksinya dalam bentuk 2D dan 3D (Wardani, 2012).

Screening ligand based drug likeness (drug scan)

Pengamatan obat dilakukan terhadap ligan yang memiliki energi ikatan yang rendah dan interaksi yang baik dengan enzim target. Analisis pengamatan obat dilakukan dengan memperhatikan *the rule of good medicine* (*Lipinski's rule of five*) yaitu berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5 , donor ikatan hidrogen <5 , akseptor ikatan hidrogen <10 , dan *refractory molar* antara 40-130 dan *bioavailabilitas* oral dari ligan. Parameter yang digunakan dapat ditentukan dengan bantuan *software Marvin Sketch* (Tambunan, 2012).

Uji Toksisitas Secara *In Silico*

Uji toksisitas yang digunakan adalah dengan menggunakan program ECOSAR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

*Docking Senyawa Turunan *isonicotinohydrazide* pada Reseptor Tuberculosis Dengan Menggunakan ArgusDock*

Docking empat senyawa Turunan *isonicotinohydrazide* dilakukan terhadap reseptor tuberkulosis yang sebelumnya telah di *download* di www.rcsb.org. Kemudian hasil *docking* dilakukan visualisasi dan di uji toksisitas menggunakan software ECOSAR.

Docking dengan ArgusDock

Sebelum dilakukan *docking* menggunakan *software ArgusLab*, dilakukan validasi dengan cara menghitung nilai RMSD. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) adalah parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kemiripan dua buah struktur. Kemiripan tersebut diukur bedasarkan perbedaan jarak atom sejenis. Nilai RMSD yang diperoleh dari reseptor dengan kode 2X23 adalah 1,9457.

Setelah didapat RMSD <2 , maka dilakukan proses *docking* pada reseptor tersebut. Pada proses *docking*, dilakukan pengaturan *grid box* yang sama dengan proses validasi. Pengaturan *grid box* ini bertujuan mengarahkan ligan senyawa turunan *isonicotinohydrazide* untuk berinteraksi pada daerah di dalam reseptor.

Analisis Hasil Docking

Berdasarkan hasil *docking* antara ligan dengan reseptordiperoleh konformasi ligan 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 *reversibel*.. Semakin kecil nilai *binding Affinity* maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi begitu pula sebaliknya semakin besar nilai *binding Affinity* maka afinitas antara reseptor.

Tabel 1. Grid Box, RMSD, Nilai *Binding Affinity*, Ligan Alami (*5-hexyl-2-(2-methyl phenoxy)phenol*) dan Isoniazid

Kode PDB	Grid Box	RMSD	Binding Affinitas Isoniazid (kcal/mol)	Binding Affinitas Ligand Alami (kcal/mol)
2X23	X : 13,25 Y : 13,25 Z : 14,75	1,591	-7,1034	-12,4738

dengan ligan semakin rendah. Grid box dan *Binding Affinity* dari ligan alami (TCU) dan pembanding isoniazid dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan hasil *docking* nilai *binding affinity* berturut-turut dari senyawa (2), (3) dan (4) adalah -7,4103; -7,9785; -8,1931 kcal/mol lebih rendah dari isoniazid (-7,1034 kcal/mol) yang berarti ketiga senyawa tersebut mempunyai interaksi yang lebih baik daripada isoniazid. Sedangkan *binding affinity* senyawa (1) adalah -6,9559

kcal/mol lebih besar dari isoniazid. Tapi jika dibanding dengan nilai *binding affinity* ligan alami (TCU), semua senyawa mempunyai binding affinity yang lebih besar dari pada TCU (-12,8804 kcal/mol).

Visualisasi Hasil Docking

Visualisasi hasil *docking* dilakukan dengan menggunakan *software Molegro Molecular Viewer* (MMV). Hal ini dilakukan untuk mengetahui interaksi antara ligan dengan residu asam amino dari reseptor tuberculosis.

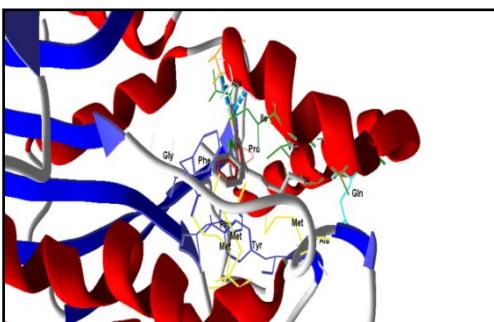
Tabel 2. Data *Binding Affinity* (□G), Jumlah ikatan hidrogen dan asam amino

Ligan/senya wa	Binding Affinity (Kkal/mol)	Jumlah Ikatan Hidrogen	Asam amino
TCU	-12,8804	2 (Met-199; Thr-196)	Met-103; Ile-202;Tyr-158;Leu-218;Ile-215;Thr-196;Met-199;Ala-198;Val-203
(1)	-6,9559	3 (Pro-156)	Gln-214;Pro-156;Phe-149;Tyr-158;Leu-218
(2)	-7,4103	1 (Pro-156)	Gln-214;Pro-156;Met-155;Val-203;Tyr-158;Phe-149
(3)	-7,9785	4 (Gln-214; dan 3(Pro-156)	Gln-214;Pro-156;Met-155;Leu-218;Try-158
(4)	-8,1931	1 (Tyr-158)	Phe-149;Tyr-158;Val-203;Met-161;Met-98;Met-103;Ile201
Isoniazid	-7,1034		

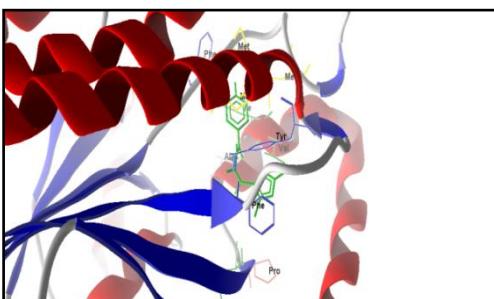
Berdasarkan data diatas dapat dilihat terdapat interaksi antara TCU dengan residu asam amino sebanyak 9 melalui ikatan hidrogen sebanyak 2. Interaksi antara senyawa (1) dengan residu asam amino sebanyak 5 melalui ikatan hidrogen sebanyak 3. Interaksi antara senyawa (2) dengan residu asam amino sebanyak 6 melalui ikatan hidrogen sebanyak 1. Interaksi antara senyawa (3) dengan residu asam amino sebanyak 5 melalui ikatan hidrogen sebanyak 4. Dan interaksi antara senyawa (4) dengan residu asam amino sebanyak 7 melalui ikatan hidrogen sebanyak 1. Dimana ikatan hidrogen merupakan ikatan antara atom H yang mempunyai muatan positif dengan atom lain yang bersifat elektronegatif

seperti O, N, F. Visualisasi 3D dari senyawa hasil docking dapat dilihat pada Gambar 2-3.

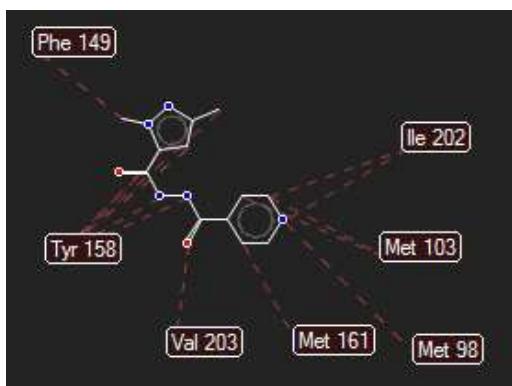
Selain interaksi melalui ikatan hidrogen, dilihat juga interaksi lainnya dengan residu-residu asam amino (gambar 2-3). Semakin banyak interaksi antara senyawa turunan *isonicotinohydrazide* dengan residu-residu asam amino maka diprediksi interaksinya semakin baik.



Gambar 2. Visualisasi 3D senyawa 5-hexyl-2-(2-methyl phenoxy)phenol (TCU) dengan reseptor InhA



Gambar 3. Visualisasi 3D senyawa 2,5-Dimethyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid N'-(pyridine-4-carbonyl)-hydrazide (senyawa 4) dengan reseptor InhA.



Gambar 3. Visualisasi 2D senyawa (4) dengan reseptor InhA

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa senyawa (4) berinteraksi dengan reseptor InhA sebanyak 7 residu asam amino. Dan dari tabel 2. dapat disimpulkan senyawa (4) dapat berinteraksi dengan residu asam amino paling banyak pada reseptor INHA maka diprediksi interaksi ini yang paling baik dibanding ketiga senyawa lainnya dan isoniazid.

Screening Ligand Based drug Likeness (Drug Scan)

Drug-likeness mengacu pada kemiripan suatu senyawa dengan obat oral (Wulandari, Evi Kristin. 2010). Metode untuk mengevaluasi *drug-likeness* yaitu menggunakan aturan *Lipinski's Rule of Five*. Aturan tersebut menetapkan bahwa molekul obat harus mempunyai massa molekul relatif <500 g/mol, nilai Log P <5, donor ikatan hidrogen <5, akseptor ikatan hydrogen <10, dan *refractory molar* antara 40-130. Berdasarkan hasil uji di dapat hasil *drug-scan* senyawa keempat senyawa turunan *isonicotinohydrazide* mempunyai berat molekul <500 g/mol; LogP <5; donor ikatan hidrogen <5; akseptor ikatan hydrogen <10, dan *refractory molar* antara 40-130. Untuk hasil lebih jelas dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Drug Scan* Menurut Aturan *Lipinski's Rule of Five*

Parameter	Senyawa			
	(1)	(2)	(3)	(4)
Log P	-1,32	-0,43	-0,15	-0,65
Donor Proton	3	3	2	2
Akseptor Proton	3	2	6	4
Berat Molekul	180	196	249	259
Refractory Molar	44,52	52,51	60,44	79,89

Nilai berat molekul berkaitan dengan proses distribusi obat. Proses distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi. Obat dengan berat molekul lebih dari 500 akan mempunyai ukuran molekul yang besar sehingga akan cukup sulit untuk menembus membran biologis. Berbeda dengan obat yang memiliki berat molekul lebih kecil akan memiliki ukuran molekul yang kecil sehingga akan memudahkan obat untuk menembus membran biologis.

Nilai log P berkaitan dengan lipofilitas atau hidrofobisitas yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid dan pelarut non polar. Dalam konteks farmakokinetik, untuk obat yang diabsorpsi melalui oral, secara normal harus melewati lipid bilayer dalam *epithelium* intestinal. Agar sistem transport efisien, obat harus cukup hidrofobik untuk menembus ke dalam lipid bilayer, tetapi tidak boleh terlalu hidrofobik karena jika obat sudah masuk ke dalam bilayer, tidak dapat menembus

keluar lagi yang akan menyebabkan obat tersebut toksik karena bertahan lebih lama di dalam tubuh. Hidrofobisitas juga berperan dalam menentukan kemana obat akan didistribusikan di dalam tubuh setelah absorpsi dan seberapa cepat obat akan mengalami metabolisme dan di ekskresikan oleh tubuh.

Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berhubungan dengan aktivitas biologis dari suatu molekul obat. Ikatan hidrogen dapat mempengaruhi sifat-sifat kimia-fisika senyawa, seperti titik didih, titik lebur, kelarutan dalam air, kemampuan dalam pembentukan kelat dan keasaman. Perubahan sifat-sifat tersebut

dapat berpengaruh terhadap aktivitas biologis senyawa.

Refractory molar merupakan suatu nilai total polarisabilitas dari molekul obat yang sangat bergantung pada suhu, indeks bias dan tekanan. Polarisabilitas adalah kemudahan suatu molekul untuk membentuk dipol sesaat atau untuk mengimbangi suatu molekul.

Uji Toksisitas

Uji Toksisitas Menggunakan Program ECOSAR

Uji toksisitas menggunakan program ECOSAR ini digunakan untuk mengetahui toksisitas terhadap organisme yang ada dalam air.

Tabel 4 Uji Toksisitas Menggunakan Program ECOSAR

No	Senyawa	MW (g/mol)	Water Solubility (mg/L)	Log Kow	Neutral organic SAR (baseline toxicity) (mg/L)		
					Fish LC ₅₀ , 96 h	Daphnid LC ₅₀ , 48 h	Green Algae EC ₅₀ , 96 h
1	Senyawa (1)	180	3,235 x 10 ⁴	-1,265	1,27 x 10 ⁵	36027,05	32791,96
2	Senyawa (2)	196	1,662 x 10 ⁴	-1,09	82983,96	24757,31	22566,05
3	Senyawa (3)	249	5545	-0,791	65780,72	20492,52	18703,25
4	Senyawa (4)	259	709,2	0,189	9009,92	3380,67	3102,95

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

Berdasarkan data pada tabel 5. menunjukkan bahwa semakin tinggi kelarutan suatu senyawa dalam air maka toksisitasnya semakin rendah dan jika dilihat dari kategori toksisitas senyawa tersebut termasuk kategori toksisitas rendah karena nilai LC₅₀ dan EC₅₀ > 100 mg/ L (http://www.epa.gov/oppt_sf/pubs/ecosar.pdf). Hal ini dikarenakan ketika suatu senyawa memiliki energi ikatan yang rendah maka ikatan antara reseptor dengan senyawa tersebut semakin kuat, sehingga senyawa tersebut lebih lama tinggal pada *lipid bilayer* dan menyebabkan toksik.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan sebelumnya maka dapat disimpulkan hasil penelitian sebagai berikut :

- Berdasarkan hasil docking nilai *binding affinity* berturut-turut dari senyawa (2), (3) dan (4) adalah -7,4103; -7,9785; -8,1931 kkal/mol lebih rendah dari isoniazid (-7,1034 kkal/mol) yang

berarti ketiga senyawa tersebut mempunyai interaksi yang lebih baik daripada isoniazid. Sedangkan *binding affinity* senyawa (1) adalah -6,9559 kkal/mol lebih besar dari isoniazid.

- Hasil uji toksisitas menggunakan program ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*) bahwa senyawa keempat turunan *isonicotinohydrazide* memiliki nilai LC₅₀ dan EC₅₀ > 100 mg/ L sehingga termasuk dalam kategori rendah karena > 100 mg/ L.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilaksanakan penelitian lanjutan seperti sintesis dan uji aktivitas anti tuberkulosinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Barker, L F, Brennam, J.B, Rosenstein, P.K., dan Sadoff, J C. 2009. Tuberculosis Vaccine Research : the Impact of Immunology. COIMMU.

- Bernardes-Génisson, V.; Deraeve, C.; Chollet, A.; Bernadou, J.; Pratviel, G. 2013.. Isoniazid: An uptake on the multiple mechanisms for a singular action. *Curr. Med. Chem.* 20, 4370–4385.
- Castagnolo dkk. 2008. Synthesis, biological evaluation and SAR study of novel pyrazole analogues as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem.* 15;16(18):8587-91.
- Firdaus, Ahyar Ahmad dan Maria Claudia Vega. 2013. Potensi 2-Feniletil Pentanoat untuk Meningkatkan Aktivitas Antibiotik InH, Am dan Eta Terhadap *Mycobacterium Tuberculosis* Strain H37Rv. *MANASIR.* Vol.1 no.1 : 75-82
- Judge, V.; Narasimhan, B.; Ahuja, M. 2012. Isoniazid: The magic molecule. *Med. Chem. Res.* 21, 3940–3957.
- Luckner, 2010, A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biol Chem.* 2010 May 7;285(19):14330-7
- Malhotra, Manav et al. 2011. Synthesis and Evaluation of Some Novel derivatives of 2-Propoxybenzylideneisonicotinohydrazide for Their Potential Antimicrobial activity. *Journal of The SerbianChemical Society.* 589-597.
- Mantegazza dkk. 1952. Effect of certain thiourea and thiazole derivatives on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Boll Soc Ital Biol Sper.*28(8-10):1596-9.
- Rastogi N, Goh KS. 1990. Action of 1-isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazine against the *Mycobacterium avium* complex and enhancement of its activity by m-fluorophenylalanine. *Antimicrob Agents Chemother* ; 34:2061-4.
- Schroeder, E.K.; de Souza, O.N.; Santos, D.S.; Blanchard, J.S.; Basso, L.A. 2002. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3, 197–225.
- Scior, T.; Garcés-Eisele, S.J. 2006. Isoniazid is not a lead compound for its pyridyl ring derivatives, Isonicotinoyl amides, hydrazides, and hydrazone: A Critical Review. *Curr. Med. Chem.* 13, 2205–2219.
- Singh M, Raghav N. 2011. Biological activities of hydrazones: a review. *IJPPS* ; 3:26-32.
- Tambunan , Usman Sumo Friend, Noval Amri and Arli Aditya Parikesit. 2012 In silico design of cyclic peptides as influenza virus, a subtype H1N1 neuraminidase inhibitor. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(52).
- Vinšová, J.; Imramovský, A.; Jampílek, J.; Monreal, J.F.; Doležal, M. 2008. Recent Advances on Isoniazide Derivatives. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 7, 1–20.
- Wardani, Firmansyah. 2012. *Studi Derivat Ribavirin dan GTP sebagai Inhibitor Untuk NS5 Metiltransferase Virus Dengue* [Skripsi]. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Widyanto, F Candra dan Cecep Tribowo. 2013. *Trend Disease : Trend Disease Penyakit Saat Ini.* Jakarta : Trans Info Media
- www.epa.gov/oppt/newchems/tools/21ecosar.htm
- www.rcsb.org/pdb/