

Studi *In Silico* Senyawa N-(piperidin-1-ylmethyl)pyrazine-2-carboxamide dari turunan pirazinamid sebagai antituberculosis

Computational

Rifki aliyusidik^{1*}, Ruswanto².

¹Departement Chemical, Faculty of Pharmacy, STIKes Bakti Tunas Husada, Cilolohan, Tasikmalaya, 46115, Jawa Barat.

*Corresponding author email: rifkialiyusidik15@gmail.com

Received 28-10-2021

Accepted 11-11-2021

Available online 15-12-2021

ABSTRAK

Tuberculosis atau yang sering di kenal yaitu TB merupakan penyakit menular secara langsung yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui interaksi dari senyawa dari salah satu turunan pirazinamid yaitu n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide terhadap reseptor 2WTA secara insilico. Metode yang digunakan yaitu penambatan molekul, dan virtual screening.

Hasil virtual screening dari senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide menunjukkan bahwa ligan n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide dapat berikatan dengan reseptor 2WTA dengan nilai energi bebas (ΔG) -6.58 kcal/mol dan nilai K_i 14.98 μM . Hal ini dapat menunjukkan bahwa ligan n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide memiliki tingkat afinitas dan kestabilan terhadap reseptor 2WTA diprediksi lebih baik dan poten sebagai obat antituberculosis dibandingkan ligan alami.

Kata kunci: *Turunan pirazinamide, antituberculosis, In Silico.*

ABSTRACT

*Tuberculosis or what is often known as TB is a direct infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. The purpose of this study was to determine the interaction of compounds from one of the pyrazinamide derivatives, namely n- (piperidine -1-ylmethyl) pyrazine -2-carboxamide against the 2WTA receptor insilico. The methods used are molecular tethering, and virtual screening.*

The results of a virtual examination of the compound n- (piperidine -1-ylmethyl) pyrazine -2-carboxamide showed that the ligand n- (piperidine -1-ylmethyl) pyrazine -2-carboxamide could bind to the 2WTA receptor with a free energy value (ΔG) of -6.58 kcal/mol and a K_i value of 14.98 μM . This can indicate that the n- (piperidine -1-ylmethyl) pyrazine -2-carboxamide ligand has a better affinity and stability for the 2WTA receptor and has potential as an antituberculosis drug compared to natural ligands.

Key words: *Pyrazinamide derivatives, antituberculosis, In Silico.*

Pendahuluan

Tuberculosis (TBC) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini sebagian besar menyerang paru-paru (TB paru), tetapi dalam kasus lain *mycobacterium tuberculosis* ini dapat menyerang hampir seluruh organ manusia. Penyakit TB ini diperkirakan telah menginfeksi sekitar sepertiga penduduk dunia. Sekitar 95% kasus dan 98% kematian akibat TB ini banyak terjadi di negara-negara berkembang (Widya, 2015)

Berdasarkan data Kemenkes RI (2018), jumlah pasien baru TB paru Basil Tahan Asam (BTA) positif tahun 2018 di Nusa Tenggara Timur (NTT) sebanyak 3.391 (pria 2010 dan wanita 1381). Menurut Dinas Kesehatan Kota Kupang (Dinkes Kota Kupang), jumlah pasien TB di Kota Kupang tahun 2018 adalah 645 (pria 374 dan wanita 271). Pengobatan TB menggunakan Obat Anti Tuberculosis (OAT) dengan obat pilihan pertamanya adalah Isoniazid (H), Rifampisin (R), Pirazinamid (Z), Streptomisin (S) dan Etambutol (E). Ketidaksihinggaan penggunaan OAT, seperti dosis yang kurang atau lebih dan lama pengobatan yang tidak sesuai akan menjadi penyebab tidak tercapainya efektivitas terapi pada pasien TB, kekambuhan serta resistensi penggunaan OAT (Kemenkes, 2014).

Pyrazinamide (PZA) merupakan obat antituberculosis lini pertama yang digunakan sebagai terapi kombinasi dengan obat antituberculosis lain, seperti isoniazid, rifampisin dan etambutol. Pirazinamid merupakan turunan asam nikotinat, struktur molekul mirip dengan isoniazid. Pirazinamid bersifat bakterisidal dan memiliki efek sterilisasi pada media asam dalam makrofag dan peradangan

akut. *Mycobacterium tuberculosis* adalah satu satunya microorganism yang rentan terhadap pirazinamid. Pirazinamid diabsorpsi dengan baik melalui tractus gastrointestinal dan secara luas didistribusikan keseluruh tubuh. Obat ini dimetabolisme oleh hepar, dan diekskresikan oleh ginjal (Arbex et al., 2010)

Pada penelitian ini dilakukan tahapan preparasi senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide yang di ambil dari turunan pirazinamid dengan memaparkan hasil analisis kandungan senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide yang merupakan turunan pirazinamid dengan menggunakan metode docking (*in silico*) secara penambatan molekul terhadap reseptor tuberculosis. Oleh karena itu perlu dilakukan prediksi aktivitas melalui interaksi suatu protein tertentu terhadap ligan dengan menggunakan metode *molecular docking* terhadap protein tersebut.

Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah berupa perangkat berat dan lunak computer. Perangkat tersebut berupa computer personal dengan spesifikasi AMD Ryzen 3 5300U with Radeon Graphics 2.60 GHz 8GB 64-bit RAM, dengan sistem operasi Windows 11 Profesional. Perangkat lunak yang digunakan adalah MarvinSketch, AutodockTools, Molegro Molecul Viewer, Discovery Studio, *pcksm* dan *Lipinski's rule of five*.

Bahan

Struktur *Smiles* senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide di copy dari situs *PubChem* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> lalu dipaste ke software *Marvinsketch* dalam

bentuk 2D dan disimpan. Struktur protein Nicotinamidase (PDB ID: 2WTA) diunduh di *RCSB Protein Data Bank* pada website : <https://rscb.org>.

Metode Penelitian

Preparasi Struktur 3D Protein 2WTA

Protein 2WTA dilakukan preparasi menggunakan software *AutoDock* dengan dihilangkan airnya dan ditambahkan atom hidrogen polar serta penambahan energi. Lalu menggunakan software *Molegro Molecular Viewer* dengan memisahkan antara *native ligand* dengan protein dan dihilangkan kofaktor jika ada. Menurut

Preparasi Struktur 2D Senyawa N-(piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2-carboxamide

Struktur 2D senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide dioptimasi dan diprotonisasi pada Ph 7,4 serta dilakukan conformer menggunakan software *MarvinSketch*.

Validasi Metode

Software *Autodock Tools* digunakan untuk validasi metode molecular docking dengan *redocking native ligand* dan protein dari reseptor Nicotinamidase yang sebelumnya dihilangkan *native ligand* – nya. Output dari validasi metode molecular docking ini adalah nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) dengan nilai yang dapat diterima yaitu < 2 Å.

DrugScan

Pengamatan obat dilakukan pada ligan yang memiliki energi ikatan rendah dan interaksi baik dari protein target. Pengamatan dan analisis obat dilakukan dengan mengamati aturan pengobatan yang baik (*Lipinski Rule of Five*) dan bioavailabilitas oral dari ligan. Parameter yang digunakan yaitu berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5, donor ikatan

hydrogen <5, akseptor ikatan hydrogen <10, dan refractory molar antara 40-130.

Pcksm

pcKSM ini digunakan untuk memprediksi sifat farmakokinetik Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Eksresi (ADME) dari suatu senyawa dengan melihat parameter Caco-2 permeability, intestinal absorption, volume distribusi, blood brain barrier, renal OCT2 substrate untuk menjadi calon obat.

Penambatan Ligan Uji n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide terhadap Protein Reseptor Nicotinamidase

Senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide yang telah dioptimasi selanjutnya di tambatkan dengan protein Nicotinamidase yang sudah dipisahkan antara *native ligand* dengan *ligand* alaminya dengan menggunakan *AutoDock Tools* dengan prosedur yang sama pada saat validasi metode protein Nicotinamidase. Output yang didapat dari hasil penambatan yaitu adanya konformasi ikatan senyawa antara protein Nicotinamidase dan ligan uji dengan nilai energi ikatan serta ikatan hidrogen.

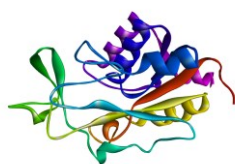
Hasil dan Pembahasan

Preparasi Struktur 3D Protein Nicotinamidase

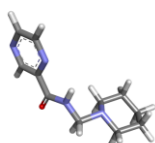
Protein dari Nicotinamidase dipisahkan terlebih dahulu dari *native ligand* – nya menggunakan software *Molegro Molecular Viewer*, lalu setelah dipisahkan *native ligand* dan protein ditambahkan hidrogen serta dihilangkan air beserta kofaktornya, dapat dilihat dari gambar 1 dan 2. Menurut (Rastini et al., 2019) pemisahan dari protein dengan *native ligand* – nya bertujuan agar menyediakan tempat untuk ligan uji

yaitu n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide untuk dapat berikatan dengan protein Nicotinamidase. Rantai protein yang diambil dalam pengujian ini yaitu rantai A yang berikatan dengan *native ligand* VGL asam pirazin-2- karboksilik yang dapat berfungsi sebagai inhibitor Nicotinamidase.

Gambar 1 Visualisasi 3D protein sesudah dipisah.



Gambar 2 Visualisasi 3D native ligand setelah dipisah.

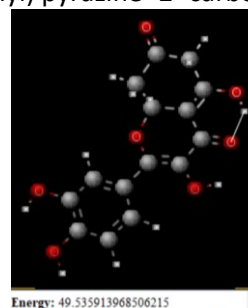


Preparasi Struktur 2D Senyawa - (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide

Struktur 2D n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide dari *ChemDraw* yang diambil dari Pubchem yang berupa struktur *SMILES* dioptimasi dan protonisasi dengan menggunakan *software MarvinSkecth* dengan diprotonisasi pada pH 7,4 dengan metode *Major Microspecies* agar sesuai dengan pH darah. Setelah itu struktur dari n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide dilakukan *Conformational search* agar didapatkan struktur dari n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide yang paling sesuai dan cocok dengan reseptor atau protein dari Nicotinamidase (Ruswanto,

Garna, et al., 2018). Metode *conformers* digunakan untuk mendapatkan konformasi struktur ligan dari senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide, didapatkan sekitar 10 konformasi ligan lalu diambil konformasi ligan yang memiliki energi paling kecil yaitu 49,53 kcal/mol struktur dapat dilihat pada gambar 3.

Gambar 3 Visualisasi 3D hasil protonisasi dan optimisasi senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide.



Validasi Metode

Pada validasi metode ini melibatkan *redocking* antara *native ligand* dengan protein dari reseptor Nicotinamidase, prosedur validasi metode ini juga akan digunakan pada saat penambatan antara protein dengan ligan uji. Output yang didapatkan dari validasi metode ini adalah nilai RMSD, nilai RMSD dinyatakan valid apabila hasil test *ligand* diperoleh hasil kurang dari atau sama dengan 2 (Ruswanto, Mardianingrum, et al., 2018). Pada hasil didapatkan nilai RMSD dari native ligand yaitu 1,22 Å yang berarti bahwa metode *molecular docking* dapat diterima atau tervalidasi. Visualisasi dari validasi metode dapat dilihat dari gambar 4.

Gambar 4. Visualisasi hasil validasi metode *docking*



Metode untuk mengevaluasi drug-likeness menggunakan *Lipinski's rule of five* pengujian ini dilakukan untuk mengetahui sifat psikokimia dari ligan berdasarkan Lipinski's rule of five dan Hasil dari uji tersebut senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide memenuhi semua parameter yang digunakan untuk menjadi calon obat, dapat dilihat pada tabel 1.

Skrining Ligan Senyawa

Tabel 1. Hasil drug-likeness menggunakan *Lipinski's rule of five* Ligan Uji - (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide

Nama Senyawa	Parameter				
	Berat Molekul	Donor Hidrogen	Akseptor Hidrogen	LogP/Lipopili tas	Refraksi Molar
	<500 g/mol	< 5	< 10	< 5	40 - 130
n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide	312	5	6	-0.053101	77.14578 2

Pcksm

Metode untuk melakukan prediksi farmakokinetika terhadap ligan n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide menggunakan pkSCM online tools yang diakses pada situs web <http://biosig.unimelb.edu.au/pkscm/prediction>. Dengan melihat parameter Caco-2 permeability, intestinal absorption, volume distribusi, blood brain barrier, renal OCT2 substrate untuk menjadi calon obat, dapat dilihat pada tabel 2.

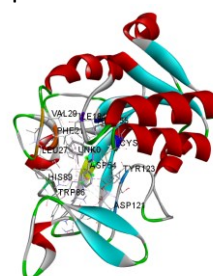
Tabel 2. Hasil drug-likeness menggunakan *Lipinski's rule of five* Ligan Uji - (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide

Nama Senyawa	Parameter				
	Caco2	Intestinan absorptio n	VDss	BBB	Renal OCT2 substrate
	Log cm/s	%	Log L/kg	LogBB	Yes/No
n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide	1.203	96.1	0.479	-0.233	No

Penambatan Ligan Uji n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide Terhadap Protein Reseptor Nicotinamidase

Ligan uji yaitu senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide yang telah dioptimasi dan diprotonisasi selanjutnya di tambatkan dengan protein dari reseptor Nicotinamidase yang telah dipreparasi menggunakan metode yang sama seperti validasi metode *docking* reseptor, hanya saja titik koordinat yang dipakai pada saat menjalankan grid box disamakan dengan hasil validasi metode *docking* reseptor yang telah tervalidasi yaitu (X = -8.856, Y = 5.901 dan Z = -15.695). Hasil visualisasi dari penambatan ligand uji dan protein dapat dilihat pada gambar 5.

Gambar 5. Visualisasi hasil penambatan ligan uji dan protein Nicotinamidase



Semakin kecil nilai ΔG maka semakin stabil dan semakin tinggi nilai afinitasnya (Ruswanto, Mardianingrum, et al., 2018). Hasil *binding energi* yang diperoleh dari penambatan antara senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide terhadap protein Nicotinamidase dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil *Docking Native Ligand* pada Protein Nicotinamidase dengan Ligan Uji - (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide

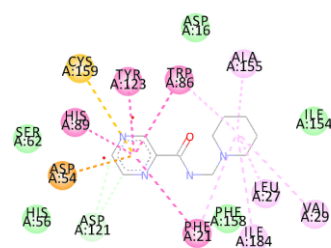
Protein Target	Ligand	Binding Energy (ΔG)	Hydrogen Bond
Nicotinamidase	Native Ligand	-3.37 kcal/mol	Cys A:159
	n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide	-6.58 kcal/mol	ASP A:121

Hasil *binding energy* (ΔG) dari senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2-

carboxamide dan native ligan sama – sama bernilai negatif akan tetapi nilai

dari binding energi ligan uji lebih kecil yaitu (-6.58 kcal/mol) dibandingkan dengan *binding energy* dari *navite ligand* (-3.37 kcal/mol) hal ini menunjukkan bahwa ikatan dari ligan uji lebih baik dan stabil dibandingkan dengan ikatan *native ligand* terhadap protein Nicotinamidase yang dapat dilihat pada gambar 6.

Gambar 6 Visualisasi interaksi 2D antara protein dengan ligan uji



Terlihat pada gambar 6 ligan uji n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide memiliki ikatan hidrogen terhadap residu asam amino dari protein Nicotinamidase (ASP A: 121)

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas dapat ditarik kesimpulan yaitu senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide telah memenuhi kriteria dijadikannya sebagai calon obat dimulai dari *DrugScan Lipinski rule of five* dan *Pcksm*. Ligan uji dari senyawa n- (piperidin -1-ylmethyl) pyrazine -2- carboxamide juga memiliki kemampuan sebagai penghambat protein dari reseptor Nicotinamidase dengan adanya ikatan hidrogen dengan residu asam amino meskipun tidak sebaik *native ligand* – nya.

Daftar Pustaka

Ruswanto, R., Garna, I. M., Tuslinah, L., Mardianingrum, R., Lestari, T., & Nofianti, T. (2018). Kuersetin,

Penghambat Uridin 5-Monofosfat Sintase Sebagai Kandidat Anti-kanker. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 14(2), 236. <https://doi.org/10.20961/alchেমy.14.2.14396.236-254>

Ruswanto, R., Mardianingrum, R., Lestari, T., Nofianti, T., Tuslinah, L., & Nurmalik, D. (2018). In Silico Study Of The Active Compounds In Bitter Melon (*Momordica charantia* L) As Antidiabetic Medication. *Pharmaciana*, 8(2), 194. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v8i2.8993>

Arbex, M.A., Marilia, C.L.V., Helio, R.S., Fernando, A.F.M. 2010. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situation. Part 1: First-line drug. *J Bras Pneumol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085830>

Depkes RI. 2014. Riset Kesehatan Dasar. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI

Giovanni D, M. Sali, F. Giovanni. 2013. The Biology of Mycobacterium tuberculosis infection, Rome: Mediterranean Journal of Hematology and Infection Disase. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867229>

Ruswanto, R., Mardianingrum, R., Siswandono, S., dan Kesuma, D. (2020) Reverse Docking, Molekular Docking, Absorption, Distribution, and Toxicity Prediction of Artemisinin as an Anti-diabetic Candidate. *Molekul*, 15(2), 88-96.

Ruswanto, R., Miftah, A. M., & Tjahjono, D. H. (2021). In silico study of 1-benzoyl-3-methylthiourea derivatives activity as epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor candidates.

Chemical Data Collections, 34,
100741.

Ruswanto, R., Nofianti, T.,
Mardianingrum, R., & Kesuma, D.
(2022). Design, molecular docking,
and molecular dynamics of

thiourea-iron (III) metal complexes
as NUDT5 inhibitors for breast
cancer treatment. *Heliyon*, 8(9).

