

Potensi Antimalaria Senyawa Azadiractin, Gedunin, dan Nimbolide dalam Mengikat PfATP6 dan Menghambat *Lactate Dehydrogenase* : Studi *In silico*

Rizki Yuda Purnomo*, Reza Hakim**, Dini Sri Damayanti**

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

e-mail: rizkiyudapurnomo@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Daun mimba mengandung senyawa aktif Azadiractin, Gedunin, dan Nimbolide yang memiliki efek anti-plasmodium. Namun, mekanisme senyawa tersebut belum diketahui. Oleh sebab itu, penelitian mengenai mekanismenya secara *In silico* dapat dilakukan. PfATP6 adalah target protein artemisinin sedangkan *Lactate dehydrogenase* adalah target protein mefloquin.

Metode: Penambatan senyawa aktif Azadiractin, Gedunin, dan Nimbolide terhadap protein target PfATP6 dan *Laktat dehydrogenase* di evaluasi secara *In silico* menggunakan *docking server* dengan Artemisinin dan Mefloquin sebagai kontrol.

Hasil: Gedunin memiliki energi ikatan bebas (ΔG) lebih kecil, interaksi permukaan lebih besar, dan tapi tidak memiliki persamaan ikatan dengan residu asam amino pada protein PfATP6 dibandingkan kontrol Artemisinin. Gedunin, Azadiractin, dan Nimbolide memiliki (ΔG) lebih besar daripada kontrol Mefloquin serta berikatan dengan sisi aktif *Lactate dehydrogenase*.

Kesimpulan: Azadiractin, Gedunin, dan Nimbolide diprediksi mempunyai potensi sebagai antimalaria dengan penghambatan pada *Lactate Dehydrogenase*

Kata Kunci: Antimalaria, Azadiractin, Gedunin, Nimbolide, *In silico*

Antimalarial Potential of Azadiractin, Gedunin, and Nimbolide to Bind PfATP6 and Inhibit *Lactate Dehydrogenase* : In Silico Study

Rizki Yuda Purnomo*, Reza Hakim**, Dini Sri Damayanti**

*Student of Faculty of Medicine, Islamic Malang University

**Lecturers of Faculty of Medicine, Islamic Malang University

e-mail: rizkiyudapurnomo@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Neem leaf contains Azadiractin, Gedunin, and Nimbolide that has anti plasmodial effect. But, their mechanism is still unknown. Therefore, further research is needed to find the mechanism. PfATP6 is a protein target of artemisinin and lactate dehydrogenase is a protein target of mefloquin.

Method: The effectivity of Azadiractin, Gedunin, and Nimbolide to inhibit PfATP6 and *Lactate dehydrogenase* evaluated by *docking server* with Artemisinin and Mefloquin as a control.

Result: Gedunin has lower free binding energy (ΔG), higher surface interaction, but doesn't have binding similarity with amino residue of PfATP6 compared with Artemisinin as a control. Gedunin, Azadiractin, and Nimbolide has higher (ΔG) than Mefloquin as a control and it's bind in active side of *Lactate dehydrogenase*.

Conclusion: Azadiractin, Gedunin, and Nimbolide predicted has antimalarial potential with inhibitory activity in *Lactate Dehydrogenase*

Keywords: Antimalarial, Azadiractin, Gedunin, Nimbolide, *In silico*

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit infeksi dengan morbiditas dan mortalitas tertinggi di daerah tropis dunia.¹ Di dunia terdapat 211 juta kasus dan kematian sekitar 445.000 akibat malaria pada tahun 2015.² Indonesia memiliki prevalensi malaria sebesar 0,6 % di tahun 2010 dan meningkat menjadi 1,3 % di tahun 2013.³

Malaria disebabkan oleh parasit *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium falciparum* dengan vektor *Anopheles sp* betina.⁴ Malaria falciparum (MF) adalah infeksi *P.falciparum* yang memiliki angka kejadian, kemungkinan komplikasi, dan fatalitas lebih tinggi dari pada malaria lainnya di Indonesia.⁵ Tatalaksana terhadap MF diperlukan untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas penderita MF.

Tatalaksana MF selama ini menggunakan *artemisinin combination therapy* (ACT) yang terdiri dari artemisinin yang dikombinasikan dengan mefloquine.^{6,7} Artemisinin membunuh *P. falciparum* dengan cara menginduksi radikal bebas intraseluler.⁸ Artemisinin juga diketahui berikatan dengan protein PfATP6 sehingga menghambat Ca-ATPase dalam skizon. Sedangkan Mefloquin membunuh *P. falciparum* dengan cara menghambat *lactate dehydrogenase* sehingga menurunkan jumlah NADH dan produksi energi dalam plasmodium.⁹ Penggunaan kedua obat ini memerlukan biaya yang mahal dan dapat menyebabkan efek samping berupa mual, muntah, diare, cephalgia, anoreksia, dan urtikaria.⁹ Oleh sebab itu, diperlukan inovasi dalam tatalaksana MF yang memiliki efek samping lebih rendah dan lebih murah salah satunya herbal.

Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) merupakan tanaman yang mudah ditanam, dibudidayakan, dan sudah dikenal oleh masyarakat.¹⁰ Penelitian oleh Longe dan Ajibaye tahun 2015 membuktikan bahwa ekstrak metanol dari daun mimba dapat membunuh *Plasmodium berghei* NK 65 secara *in vivo* pada tikus albino. Ekstrak etanol daun mimba juga dapat membunuh *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*¹¹ dan *Plasmodium falciparum* resisten klorokuin.¹² Ekstrak metanol mimba memiliki senyawa nimbolide, gedunin, dan azadirachtin¹³ yang dapat membunuh *P.falciparum*.¹⁴ Mekanisme senyawa ekstrak metanol daun mimba masih belum diketahui sehingga diperlukan penelitian lanjutan mengenai mekanismenya dalam membunuh *P.falciparum*. Selama ini mekanisme membunuh *P.falciparum* yang telah diketahui adalah dengan cara berikatan protein PfATP6 dan *lactate dehidrogenase*. Hal ini menyebabkan kedua protein tersebut dapat dijadikan protein target dalam membunuh *P.falciparum*.

Mekanisme kerja senyawa herbal dapat dianalisa dari studi *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Metode ini digunakan untuk mengetahui energi bebas, interaksi permukaan, dan konstanta inhibisi dari ikatan antara senyawa herbal dan reseptor target dari obat artemisinin dan mefloquin. Penelitian studi *in silico* senyawa ekstrak metanol mimba terhadap protein PfATP6 dan *lactate dehydrogenase* sebagai protein target MF belum pernah diteliti.

Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti ingin meneliti tentang studi *in silico* Azadirachtin, Gedunin, dan Nimbolide terhadap protein PfATP6 dan *Lactate dehydrogenase*. Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan potensi antiplasmodial senyawa ekstrak metanol daun mimba yang berperan dalam membunuh *P.falciparum*.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode *Insilico* dengan melakukan penambatan senyawa daun Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) yang terdiri dari Azadirachtin, Nimbolide, dan Gedunin ke *Lactate dehydrogenase* dan PfATP6.

Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Januari sampai dengan Mei 2019

Alat dan Bahan

Struktur senyawa aktif daun mimba yang terdiri dari Azadirachtin, Nimbolide, Gedunin, Artemisin, dan Mefloquin yang didapat pada PubChem. Struktur *Lactate dehydrogenase* (UniProt ID: P13774) dan PfATP6 (UniProt ID: Q5R2K6) didapatkan dari www.uniprot.com. *Lactate dehydrogenase* dan PfATP6 yang digunakan adalah protein dari spesies *Plasmodium falciparum*. Perangkat keras: Intel® Pentium® Core i5 @ 1.86Ghz, RAM 4 GB, Windows 8 64-bit Operating System terhubung dengan koneksi internet.

Uji *in silico* Senyawa Aktif Daun Mimba terhadap *Lactate dehydrogenase* dan PfATP6

Senyawa ligan dapat diunduh di Pubchem kemudian dilakukan uji *molecular docking* menggunakan *docking server*. *Docking server* dapat diakses di www.dockingserver.com

Teknik Analisa Data

Hasil uji *In silico* diamati dengan energi ikatan bebas (ΔG), interaksi antarmolekul, interaksi permukaan antara ligan dan protein target

HASIL PENELITIAN

Hasil dan Analisa Data Uji *Molecular Docking* Senyawa Daun Mimba

Hasil uji *molecular docking* dari senyawa daun mimba dapat terdapat pada **tabel 1**. Energi bebas yang dihasilkan dari interaksi senyawa tersebut terhadap protein target PfATP6 dari terkecil hingga terbesar adalah Gedunin, Azadirachtin, dan Nimbolide. Senyawa aktif daun Mimba yang memiliki energi bebas lebih kecil daripada Artemisinin adalah Gedunin.

Selain menggunakan protein target PfATP6, penelitian ini juga menggunakan protein target *Lactate Dehydrogenase*. Hasil uji *molecular docking* senyawa aktif daun Mimba dengan protein target *Lactate Dehydrogenase* menghasilkan energi bebas dari terkecil hingga terbesar adalah Gedunin, Azadirachtin, dan Nimbolide. Senyawa dari daun Mimba memiliki energi bebas lebih besar daripada senyawa Mefloquin.

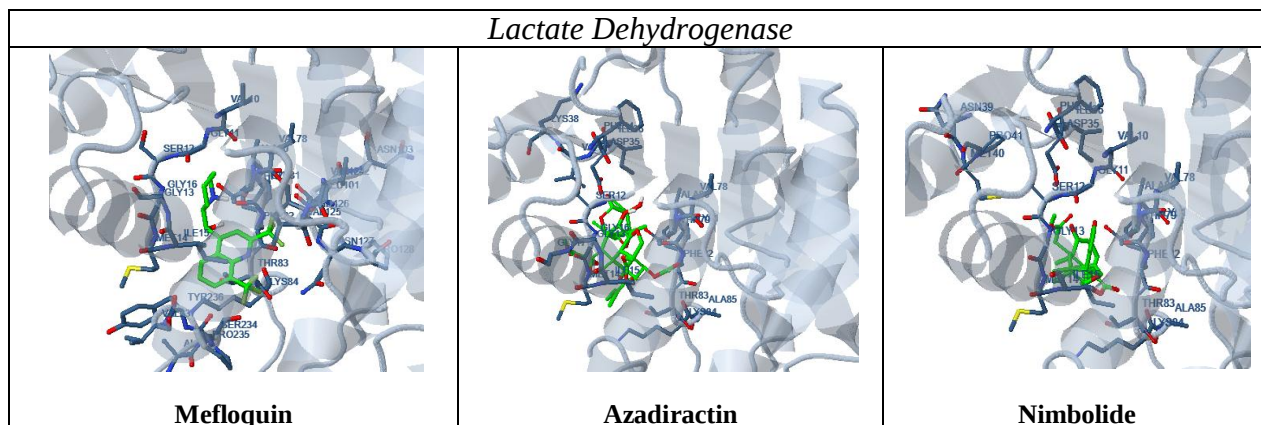
Interaksi antarmolekul senyawa daun Mimba dengan protein PfATP6 dan *Lactate Dehydrogenase* terlihat pada **tabel 1**. Senyawa aktif dari daun mimba dan Artemisinin tidak mempunyai persamaan ikatan terhadap residu asam amino PfATP6. Interaksi antarmolekul Artemisinin dengan protein PfATP6 memiliki ikatan hidrofobik pada residu asam amino TYR803 dan VAL 803. Interaksi antarmolekul senyawa Mimba memiliki ikatan hidrogen dan ikatan

hidrofobik serta residu asam amino ILE531, ILE933, LYS803, ASN 934, dan ARG801.

Hasil yang berbeda didapatkan pada protein target *Lactate Dehydrogenase*. Mefloquin berikatan dengan *Lactate Dehydrogenase* memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen pada residu asam amino MET14, ILE15 dan GLY81. Azadirachtin memiliki ikatan hidrofobik dengan residu asam amino yang sama pada sisi aktif *Lactate Dehydrogenase* sebesar 100%, sedangkan Nimbolide memiliki kesan mengikat residu asam amino pada sisi aktif *Lactate Dehydrogenase* sebesar 50%.

Interaksi permukaan senyawa daun mimba terhadap protein target PfATP6 dan *Lactate Dehydrogenase* terlihat pada **tabel 1**. Senyawa daun mimba memiliki interaksi permukaan terhadap PfATP6 dari yang tertinggi hingga terendah adalah Azadirachtin, Gedunin, dan Nimbolide. Senyawa aktif tersebut memiliki interaksi permukaan yang lebih besar daripada artemisinin.

Hasil yang sama juga didapatkan dari penambatan Senyawa daun mimba pada *Lactate Dehydrogenase*. Senyawa daun mimba memiliki hasil interaksi permukaan terhadap *Lactate Dehydrogenase* dari yang terbesar hingga terkecil adalah Azadirachtin, Gedunin, dan Nimbolide. Senyawa tersebut memiliki interaksi permukaan lebih besar daripada Mefloquin.



Gambar 1. Interaksi Ligan dan Protein *Lactate Dehydrogenase*

Gambar 1 menunjukkan interaksi ligan mefloquin, azadirachtin, dan nimbolide terhadap protein *Lactate dehydrogenase*. Terdapat persamaan ikatan pada asam amino MET 14 dan ILE 15

Tabel 1. Hasil Molecular Docking Senyawa Daun Mimba

Ligan	Target	Energi Bebas (kcal/mol)	Interaksi Antar Molekul	Interaksi Permukaan (Å ^o)
Artemisinin (K)	PfATPase	-6,32	IF : TYR803, VAL 803 IG : -	497,995
Azadirachtin		-5,81	IF : ILE531, ILE933 IG : LYS803	1119,552
Gedunin		-6,43	IF : ILE531, ILE933 IG : ASN 934	842,21
Nimbolide		-5,41	IF :- IG : ARG801	660,712
Mefloquin (K)	Lactate Dehydrogenase	-9,78	IF : MET14* , ILE15* IG : GLY81	773,152
Azadirachtin		-6,38	IF : MET14* , ILE15* , VAL37, PHE82 IG :-	1148,758
Gedunin		-6,42	IF : ILE36, ALA80, PHE83 IG : THR79, THR83	992,825
Nimbolide		-6,05	IF : MET14* , MET40, PHE82 IG : THR83	909,867

Keterangan : K, Kontrol; IF, Ikatan Hidrofobik; IG, Ikatan Hidrogen; *, persamaan ikatan dengan kontrol

PEMBAHASAN

Uji Molecular Docking Senyawa Daun Mimba

Molecular docking umumnya digunakan dalam perkembangan obat yang mampu memprediksi ikatan antara ligan dan protein target dengan melihat afinitas dan interaksi ikatan. Afinitas merupakan kemampuan mengikat suatu protein target. Kekuatan afinitas ikatan ligan-protein target dipengaruhi oleh energi ikatan bebas, interaksi permukaan, dan interaksi antarmolekul.¹⁶ *Molecular docking* dapat menggunakan *blind docking* atau *docking* dengan kontrol. Pada penelitian ini, *docking* dilakukan menggunakan ligan kontrol sehingga lebih akurat daripada *blind docking*.¹⁷

Energi ikatan bebas adalah energi yang ada untuk melakukan kerja. Energi ikatan bebas juga menggambarkan stabilitas dan spontanitas pengikatan antar ligan dan protein target. Ikatan dikatakan semakin spontan dan stabil jika nilai energi ikatan bebas semakin rendah. Nilai energi ikatan bebas juga dapat mempengaruhi afinitas ikatan atau kemampuan dalam berikatan. Semakin rendah nilai energi ikatan bebas maka nilai afinitas ikatan ligan dan reseptor semakin tinggi. Nilai energi ikatan bebas yang rendah mampu berikatan dengan protein target dengan kuat dan menimbulkan potensi aktifitas biologis.^{18,19}

Selain itu, interaksi permukaan yang merupakan pengenalan ligan dan protein target juga mempengaruhi ikatan antara ligan dan protein target. Interaksi permukaan dipengaruhi oleh ukuran molekul ligan. Pada penelitian ini Azadirachtin memiliki interaksi permukaan tertinggi terhadap protein target PfATP6 dan *Lactate dehydrogenase*. Nilai interaksi permukaan yang tinggi memberikan peluang yang tinggi senyawa aktif untuk berinteraksi dengan protein target. Dengan adanya peluang yang tinggi dapat menggambarkan ikatan yang kuat sehingga aktifitas biologisnya kuat.²⁰

Interaksi antar molekul adalah interaksi antara molekul dalam suatu senyawa dan ligan. Interaksi ini terbentuk dari tolakan atau tarikan yang terjadi antara molekul dan partikel terdekat salah satu contohnya adalah ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah interaksi antarmolekul yang terjadi antara unsur hidrogen dengan ion yang bersifat elektronegatif.¹⁶

Penelitian ini menggunakan Artemisinin dan Mefloquin yang merupakan tatalaksana lini pertama pada malaria falciparum^{6,7}. Artemisinin membunuh *Plasmodium sp* dengan cara berikatan pada protein PfATP6. Ikatan dengan protein PfATP6 menghambat Ca-ATPase sehingga mengganggu metabolisme parasit⁹. Mefloquin membunuh *Plasmodium sp* dengan menghambat *Lactate dehydrogenase* sehingga terjadi penurunan jumlah piruvat dalam tubuh parasit.²¹

Berdasarkan **tabel 1**, uji *molecular docking* terhadap protein target PfATP6, Gedunin memiliki energi ikatan bebas lebih kecil, dan interaksi permukaan lebih besar dibandingkan kontrol. Penelitian oleh Shandilya A, dkk menunjukkan bahwa *active site* PfATP6 adalah LEU 263, PHE264, GLN 267, ILE 977, ILE 981, ALA 985, ASN 1039, LEU 1040, ILE1041, dan ASN 1042²² Namun demikian, Gedunin tidak memiliki persamaan ikatan terhadap residu asam amino sisi aktif PfATP6 dibandingkan kontrol. Walaupun mempunyai afinitas yang lebih tinggi namun diperkirakan efek yang ditimbulkan akan lebih rendah karena tidak berikatan dengan sisi aktif dari PfATP6. Penelitian oleh Valderramos, dkk (2010) melaporkan bahwa ikatan hidrogen yang hilang antara PfATP6 dengan artemisinin menunjukkan adanya resistensi terhadap artemisinin.²³ Oleh sebab itu, senyawa Artemisinin, Gedunin, dan Nimbolide dapat berpotensi sebagai alternatif terapi pada malaria falciparum resisten artemisinin.

Pada uji dengan protein target *Lactate dehydrogenase* energi ikatan bebas Gedunin, Azadirachtin, dan Nimbolide lebih besar dibandingkan kontrol. Penelitian oleh Saddala MS, dkk menunjukkan bahwa *Lactate dehydrogenase* memiliki *active site* ILE31, GLY99, ASN140, GLY32, THR101, GLY29, THR97, ASP53, MET30, PHE52, dan GLU122²⁴. Namun, Azadirachtin mempunyai persamaan ikatan dengan residu asam amino di sisi aktif *Lactate dehidrogenase* melalui ikatan hidrofobik sebesar 100%, sedangkan Nimbolide sebesar 50%. Adapun nilai interaksi permukaan Azadirachtin dan Nimbolide lebih besar dibandingkan kontrol.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diperkirakan bahwa Azadirachtin dan Nimbolide mempunyai afinitas yang lebih rendah dibandingkan kontrol dalam menghambat *Lactat Dehidrogenase*.

KESIMPULAN

Gedunin berpotensi mampu bekerja sebagai anti malaria melalui penghambatan terhadap protein PfATP6. Azadirachtin dan Nimbolide berpotensi mampu bekerja sebagai antimalaria melalui penghambatan protein Lactat Dehidrogenase.

Perlu penelitian lebih lanjut seperti *in vitro* dan *in vivo* untuk mengonfirmasi bahwa daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) mampu sebagai antimalaria melalui penghambatan PfATP6 dan *Lactate dehydrogenase*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada ikatan orangtua mahasiswa (IOM) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011;24(2):377–410.
- WHO. World Malaria Report 2017. 2017. WHO Press, Geneva. hal1-196 .
- Kementerian Kesehatan. Situasi Malaria di Indonesia. 2014. hal. 1–8.
- Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol*. 2009;47(2):93–102.
- Elyazar IRF, Hay SI, Baird JK. Malaria Distribution, Prevalence, Drug Resistance and Control in Indonesia. *Adv Parasitol*. 2011;74:1–107.
- Kementerian Kesehatan. Pedoman Pengobatan Malaria. 2007. hal. 1–27.
- Harijanto PN. ACT sebagai Obat Pilihan Malaria Ringan di Indonesia. *CDK*. 2011;38(2):112–4.
- Cui L, Su X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;7(8):999–1013.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AB. Katzung - Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition (2012). 12 Edition. United States: Mc Graw Hill LANGE; 2012.
- Agus F, Rahayu S. Mimba dan manfaatnya. 2004. World Agroforestry Centre hal. 1–2.
- Deshpande PK, Gothwal R, Pathak AK. Phytochemical analysis and evaluation of antimalarial activity of *Azadirachta indica*. *The Pharma Innovation Journal*. 2014;3(9):12–6.
- Kirira PG, Rukunga GM, Wanyonyi AW, Muregi FM, Gathirwa JW, Muthaura CN, et al. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *J of Ethnopharmacology* 106. 2006;106:403–7.
- Girish K, S SB. Neem – A Green Treasure. *Electron J Biol*. 2008;4(3):102–11.
- Chianese G, Yerbanga SR, Lucantoni L, Habluetzel A, Basilico N, Taramelli D, et al. Antiplasmodial Triterpenoids from the Fruits of Neem , *Azadirachta indica*. *J Nat Prod*. 2010;73(8):1448–52.
- Chianese G, Lucantoni L, Serge R, Habluetzel A, Tagliatela-scafati O. Transmission blocking effects of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel limonoids on *Plasmodium berghei* early sporogonic development. *Fitoterapia*. 2016;114:122–6.
- Davarcioglu B. The General Characteristic of Weak Intermolecular Interactions in Liquids and Crystals. *Int J Mod Eng Res*. 2011;1(2):443–54.
- Hassan NM, Alhossary AA, Mu Y, Kwoh C. Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W With Inter-Process Spatio-Temporal Integration. *Sci Report*. 2017;1(15451):1–13.
- Malmstrom RD, Watowich SJ. Using Free Energy of Binding Calculations to Improve the Accuracy of Virtual Screening Predictions. *J Chem Inf Model*. 2012;51(7):1648–55.
- Damayanti DS, Utomo DH, Kusuma C. Revealing the potency of *Annona muricata* leaves extract as FOXO1 inhibitor for diabetes mellitus treatment through computational study. *In Silico Pharmacol*. 2017;5(3):1-7
- Latour RA. Perspectives on the simulation of protein-surface interactions using empirical force field methods. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;1(0):25–37.
- Penna-coutinho J, Cortopassi WA, Oliveira AA, Costa TC. Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies. *PlosOne*. 2011;6(7)
- Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, Ghosh I. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A. *Sci Rep*. 2013;3(2513):1–7
- Saddala MS, Kumar KK, Rani AU. In Silico inhibitors for *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *J Bioinforma*. 2014;14(2):146–59

23. Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann A, Fidock DA, dan Krishna S. Investigations into the Role of the Plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) L263E Mutation in Artemisinin Action and Resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 2010;54(9):3842–3852.
24. Saddala MS, Kumar KK, Rani AU. In Silico inhibitors for Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *J Bioinforma*. 2014;14(2):146–59