



In Silico Study: Andrographolide Compounds and Their Derivatives as Antimalarials Targeted at PfENR and PfLDH

Syanindita Lulu Ramadhani¹, Hamidah Hasnaussalim¹, Yonathan Adi Nugroho Sigalingging¹, Winni Nur Auli^{1*}, Anjar Hermadi Saputro¹

¹Farmasi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Jl. Terusan Ryacudu, Way Huwi, Kec. Jati Agung, Kabupaten Lampung Selatan, Lampung, Indonesia. 35365

Info Artikel

Diterima : 04-06-2024

Disetujui : 12-08-2024

Dipublikasikan : 05-05-2025

Keywords:

*Andrographolide, Antimalaria,
P. falciparum, PfENR,
PfLDH*

Abstrak

Malaria merupakan salah satu penyakit berbahaya karena dapat menyebabkan anemia dikarenakan parasit dari malaria berasal dari genus plasmodium, dapat menyerang eritrosit. Pada beberapa tahun terakhir, ditemukan protein yang dapat digunakan sebagai target antimalaria. Beberapa protein target yang dapat digunakan yaitu PfENR dan PfLDH dimana kedua protein tersebut berperan penting dalam metabolisme parasit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antimalaria pada senyawa Andrographolide yang bertarget pada PfENR dan PfLDH yang dilakukan secara *in silico* guna alternatif untuk pengembangan obat baru. Evaluasi ini dilakukan menggunakan AutoDock Tools dan Biovia Discovery Studio Visualizer. Hasil dibandingkan antara ligan natif dan senyawa target untuk menentukan senyawa yang memiliki interaksi yang paling baik, sehingga dapat disimpulkan senyawa yang berpotensi sebagai antimalaria. Adapun hasil penelitian ini menunjukkan senyawa Neoandrographolide memiliki binding affinity lebih yang rendah pada dibandingkan dengan ligan natif baik pada PfENR (TLC -7.45 kcal/mol dan Neoandrographolide -10.30 kcal/mol) dan PfLDH (CLQ -6.04 kcal/mol dan Neoandrographolide -6.83).

Abstract

*Malaria is a dangerous disease that can cause anaemia due to the parasite from the genus Plasmodium, which attacks erythrocytes. In recent years, proteins have been identified as potential antimalarial targets. Among these, PfENR and PfLDH are significant due to their crucial roles in parasite metabolism. This study evaluates the antimalarial activity of Andrographolide compounds targeting PfENR and PfLDH through *in silico* methods as an alternative approach for new drug development. The evaluation was conducted using AutoDock Tools and Biovia Discovery Studio Visualizer. The results were compared between the native ligand and the target compound to identify the compound with the best interaction, thereby determining its potential as an antimalarial agent. The findings indicate that the Neoandrographolide compound exhibits a lower binding affinity compared to the native ligand for both PfENR (TLC -7.45 kcal/mol and Neoandrographolide -10.30 kcal/mol) and PfLDH (CLQ -6.04 kcal/mol and Neoandrographolide -6.83 kcal/mol).*

Pendahuluan

Malaria adalah salah satu penyakit berbahaya yang memiliki prevalensi cukup tinggi. Pada tahun 2021 terjadi peningkatan kasus yang cukup tinggi yaitu terjadi dari 245 juta jiwa pada 2020, menjadi 247 jiwa pada tahun 2021. Indonesia yang memiliki iklim tropis beresiko mengalami peningkatan kasus malaria yang cukup tinggi sehingga penyakit ini dapat menjadi ancaman untuk masyarakat Indonesia apabila tidak ditangani dengan baik (Rosa *et al.*, 2022). Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia mencatat bahwa kasus malaria masih tinggi di Indonesia, berdasarkan data Indonesia tahun 2021 terdapat 94.610 kasus terkait malaria. Berdasarkan tahun 2018 riskesdas menyatakan jika penyakit malaria, masih menjadi masalah yang sangat penting, terutama di wilayah timur Indonesia. Salah satu wilayah timur Indonesia yang masih tinggi kasus malaria adalah Provinsi Papua. Kasus malaria di Papua mencapai 86.022 hingga saat ini. Total permasalahan malaria di Provinsi Papua mencapai hingga 90,9%. Kemudian adapun Provinsi lain di Indonesia yang memiliki resiko yang cukup tinggi yaitu, Nusa Tenggara Timur dengan total kasus 2.393 dengan proporsi sebesar 2,5% (González-Sanz *et al.*, 2023).

Malaria adalah penyakit yang menyebabkan anemia karena terjadinya penurunan sel darah merah pada pasien. Malaria disebabkan oleh parasit berasal dari genus *Plasmodium* dan menyerang eritrosit tubuh. Nyamuk *Anopheles* betina, merupakan salah *vector* penular penyakit ini ke manusia. Berdasarkan jenisnya *Plasmodium* dibagi menjadi empat yaitu *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, dan *P. malariae*, dan dari keempat jenis dapat menginfeksi manusia. Spesies *P. falciparum* merupakan salah satu spesies yang paling banyak menyerang pada negara yang memiliki iklim tropis dan subtropis. Selain itu juga infeksi spesies *P. falciparum* menunjukkan angka kematian paling banyak dibandingkan spesies lain (Malau & Azzahra, 2020).

Malaria umumnya ditangani dengan obat anti malaria seperti ekstrak kina, *cloroquine* dan primakuin. Namun menurut penelitian Rahmasari *et al* (2022) saat ini sudah ditemukan resistensi yang terjadi pada parasit *P. falciparum* yang mengakibatkan kerja obat antimalaria lebih lambat sehingga diperlukannya inovasi mengenai obat malaria yang aman, efektif, praktis, serta terjangkau secara ekonomi agar dapat mengurangi perburukan dari malaria dan mengurangi kematian. Salah satu obat obatan anti malaria yang berasal dari alam adalah kina. Kina berasal dari tanaman kina yang mengandung alkaloid pada kulit batang kina yang dapat digunakan untuk pengobatan malaria (Maxiselly, 2018). Sehingga senyawa bahan alam memiliki potensial yang besar sebagai senyawa antimalaria. Pengetahuan mengenai eksplorasi bahan alam terus dikembangkan guna meningkatkan pengetahuan mengenai bahan alam, dan senyawa yang terkandung dalam bahan alam tersebut yang dapat digunakan untuk pengembangan obat baru. Pada penelitian ini peneliti tertarik untuk mengembangkan bahan alam yang ada di sekitar, dengan tujuan menambah daftar aktivitas senyawa baru serta meningkatkan pengetahuan pembaca mengenai bahan alam dan aktivitasnya melalui publikasi karya tulis ini.

Andrographolide adalah senyawa yang termasuk kedalam golongan trihidrosilikton yang memiliki rumus molekul C₂₀H₃₀O₅. Senyawa ini merupakan salah satu senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria. Senyawa Andrographolide dapat ditemukan pada tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*) tumbuhan ini dikenal juga dengan julukan "Raja Pahit". Menurut Widywati senyawa Andrographolide memiliki potensi untuk menghambat gametosit dari spesies *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Senyawa *Andrographolide* pada tumbuhan sambiloto, dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dan mempunyai hubungan baik dengan kurkumin dan artesunate. Andrographolide-kurkumin secara *in vivo* menunjukkan aktivitas anti malaria 81% lebih tinggi daripada kontrol dan dapat memperpanjang umur hingga 2-3 kali lipat (Ratnani *et al.*, 2012)

Siklus hidup *Plasmodium* dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah enzim. Beberapa enzim yang mempengaruhi siklus hidup *Plasmodium* adalah hematin, hemozoin, plasmepsin, falcipain, falsilisin, *dihydrofolate reductase*, *dihydropteroate synthase*, *Enoyl-ACP reductase* serta *lactate dehydrogenase enzyme*, serta beberapa enzim lainnya. Beberapa enzim tersebut dapat dihambat atau dijadikan target untuk mengembangkan obat baru sebagai anti malaria (Sullivan & Sanjeev, 2005). Pada beberapa tahun terakhir, ditemukan protein target yang baik sebagai antimalaria seperti *Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* dan *Lactate Dehydrogenase* pada spesies *Plasmodium falciparum*. Protein target tersebut diambil dari jalur biosintesis asam lemak tipe II yaitu *Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)* karena dapat mengatur sintesis asam lemak pada spesies *Plasmodium falciparum*. Sehingga apabila sintesis asam lemak terhambat,

maka pertumbuhan dari *Plasmodium* juga akan terhambat (Schrader *et al.*, 2013). *Lactate Dehydrogenase* juga merupakan protein yang berperan dalam pembentukan energi pada spesies *P. falciparum*, protein ini juga memiliki kemiripan pada spesies *Plasmodium* lainnya seperti *P. vivax* dan *P. ovale* mencapai 90% dan proteininya sangat berbeda dengan *Lactate Dehydrogenase manusia* (Penna-Coutinho, et al., 2011)

Pada penelitian ini dianalisis mekanisme antara interaksi *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (PfENR) dan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* dengan ligan yang cocok yang berperan sebagai inhibitor menggunakan metode adalah *in silico*. Metode *in silico* juga sering dikenal dengan analisa *molecular docking*, metode ini dilakukan agar dapat menganalisis senyawa yang dilakukan secara eksperimental dengan metode komputasi. Pada pengujian ini dapat diketahui interaksi antara molekul senyawa target, dengan reseptor yang cocok dengan senyawa target. Interaksi antar senyawa dan reseptor, kemudian hasilnya dapat digambarkan dengan metode komputasi setelah itu dapat dijadikan sebagai *pharmacophore* suatu senyawa tertentu (Setiawan & Istyastono, 2015).

Metode

1. Bahan dan Alat

Prosedur pada penelitian ini dilakukan berdasar pada publikasi Saputro *et al.* (2023) yang telah disesuaikan. Perangkat yang digunakan adalah laptop ASUS-Notebook SKU dengan spesifikasi prosesor Intel i3 RAM 4 GB dan SSD 521 GB. Program yang digunakan meliputi KingDraw 3.0.2, Mol View (<http://www.molview.org/>), Avogadro 1.2.0, BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2024, AutoDock Tools 1.5.7, dan pkCSM (dapat diakses secara *online* pada <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsmprediction>).

2. Preparasi Protein dan Ligan

Protein yang diuji pada penelitian ini adalah *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (PfENR) (PDB ID : 1NHG) dan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* (PfLDH) (PDB ID: 1CET). Yang dapat diakses secara *online* melalui laman tautan berikut : <https://www.rcsb.org/structure/1NHG> dan <https://www.rcsb.org/structure/1CET> . Struktur protein diperoleh dari Protein Data Bank dan disiapkan dengan menghilangkan bagian sistem yang tidak diperlukan seperti ligan alami, dan air serta menambahkan atom hidrogen, dan muatan kollman menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2024 dan AutoDock Tools 1.5.7. Protein yang telah disiapkan disimpan dalam format pdbqt untuk dilakukan penambatan.

Preparasi ligan meliputi preparasi ligan alami dan ligan uji berupa senyawa turunan Andrographolide. TCL dan CLQ adalah ligan alami yang berikatan dengan protein target. Ligan alami berasal dari protein yang telah dihilangkan molekul airnya dan bagian protein lain yang tidak diperlukan menggunakan AutoDock Tools 1.5.7. Bentuk 3D dari protein tersebut kemudian disiapkan dalam perangkat lunak yang sama dan disimpan sebagai file pdbqt.

Ligan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa turunan Andrographolide. Struktur tiga dimensi ligan diperoleh dari Mol View (dapat diakses secara *online* pada <http://www.molview.org/>) dalam bentuk file Mol. Struktur tiga dimensi yang diperoleh dioptimasi menggunakan Avogadro 1.2.0, dan struktur hasil optimasi disimpan dalam bentuk file PDB. Struktur senyawa yang telah dalam bentuk file pdb disiapkan menggunakan Autodock Tools 1.5.7, dan file disimpan dalam format pdbqt (Saputro *et al.*, 2023).

3. Validasi Metode

Validasi dilakukan dengan penambatan ligan natif dengan protein yang telah dipreparasi sebelumnya. Proses ini menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.7 . Pada protein dengan kode 1NHG digunakan spesifik ukuran grid box 27 x 36 x 24, spacing 1 Å dan titik pusat sebagai berikut:

- x : 52.183
- y : 93.959
- z : 34.431

Pada protein dengan kode 1CET proses yang sama dilakukan dengan ukuran *grid box* 40 x 50 x 30, spacing 0.375 Å dan titik pusat sebagai berikut:

- x : 36.211
- y : 10.539
- z : 19.335

Metode dianggap valid jika nilai *root mean square derivatif* (RMSD) < 2 Å (Frimayanti *et al.*, 2021).

4. Proses Penambatan

Proses ini dilakukan pada setiap ligan uji protein target menggunakan AutoDock Tools 1.5.7 dengan metode docking yang telah ter-validasi terhadap protein dengan mencari 100 konformasi acak. Hasil docking ditampilkan beserta nilai *binding affinity* dan interaksi residu asam amino. Konformasi terbaik divisualisasikan dalam bentuk gambar 2D menggunakan software Biovia Discovery Studio Visualizer 2024 (Saputro *et al.*, 2023).

5. Analisis ADME

Analisis ADME (*absorption, distribution, metabolism, and excretion*) dilakukan menggunakan data yang didapatkan dari pkCSM (dapat diakses secara *online* melalui <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsmprediction>) yang didasarkan pada aturan 5 Lipinski (Pires *et al.*, 2015). Didapatkan hasil skrining sifat fisikokimia terhadap seluruh ligan natif dan ligan uji serta dievaluasi lebih lanjut (Saputro *et al.*, 2023).

Hasil dan Pembahasan

Studi *in silico* dilakukan untuk mengevaluasi interaksi antara ligan uji dengan target protein. Adapun protein target yang dipilih adalah Protein PfENR dengan PDB ID 1NHG (<https://www.rcsb.org/structure/1NHG>) dan Protein PfLDH dengan PDB ID 1CET (<https://www.rcsb.org/structure/1CET>). PfENR dipilih karena ENR (*enoyl-acyl carrier protein reductase*) merupakan salah satu enzim yang penting dalam memediasi reduksi dari protein *trans-2-enoyl-acil-carrier* yang bergantung pada NADH menjadi protein *acyl-carrier* pada jalur sistesis asam lemak tipe II (FAS-II) dalam spesies *Plasmodium falciparum*. Selain itu, struktur protein ini tidak terdapat homolognya pada tubuh manusia yang menjadikan protein ini cocok sebagai target studi (Manhas *et al.* 2018). Sedangkan PfLDH dipilih karena enzim LDH terlibat dalam pembentukan NAD+ pada langkah akhir glikolisis yang mengkatalis perubahan piruvat menjadi laktat sehingga enzim ini dibutuhkan *P. falciparum* dalam produksi energi untuk proses biokimia, pertumbuhan, dan perkembangan (Shadrack *et al.*, 2016).

Sebelum dilakukan penambatan molekul, protein target dipisahkan dengan ligan natif. Selanjutnya dilakukan penambatan ligand natif yang sudah dipisahkan menggunakan aplikasi AutoDock untuk memvalidasi metode *molecular docking* dengan melakukan penyesuaian ukuran *grid box* pada sisi aktif protein. Validasi metode bertujuan untuk menjamin metode ini dapat digunakan untuk penambatan ligan uji. Parameter yang digunakan adalah *Root Mean Square Deviation* (RMSD) yang merupakan nilai dari ukuran kuantitatif kemiripan antara dua titik koordinat atom yang dilapiskan dan paling umum digunakan. Nilai RMSD disajikan dalam Å dan dihitung dengan rumus :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

Yang dimana rata-rata dilakukan pada *n* pasangan atom ekuivalen dan *d_i* adalah jarak antara jarak antara dua atom pada pasangan ke -i. Metode ini dapat diterima jika RMSD < 2 Å (Putri *et al.*, 2019).

Pada tahap validasi protein PfENR dengan PDB ID : 1NHG metode *docking* yang valid didapatkan dengan melakukan penambatan ligan natif yang menggunakan koordinat *grid box* x : 52.183 ,y : 93.959, dan z : 34.431, dengan *grid size* 27 x 36 x 24, serta *spacing* 1 Å. Nilai RMSD yang dihasilkan pada reseptor *Plasmodium falciparum Enoyl-ACP reductase* sebesar 0.59 Å. Sedangkan validasi yang dilakukan pada protein PfLDH dengan PDB ID : 1CET dimana dilakukan juga penambatan protein yang telah dipisahkan dengan ligan natifnya menggunakan koordinat *grid box* x: 36.211, y: 10.539 dan z: 19.335 dan ukuran *grid*

box 40 x 50 x 30, serta spacing yang digunakan adalah 0.375 Å. Pada penambatan ini didapatkan nilai RMSD sebesar 1.94 Å. Hal ini menunjukkan bahwa prosedur docking dari kedua protein tersebut yang telah dilakukan dinyatakan valid karena pada ligan natif didapatkan nilai RMSD kurang dari 2 Å.

Berdasarkan analisis *molecular docking* menghasilkan beberapa data yang dapat diambil yaitu nilai *binding affinity*, RMSD, dan residu asam amino dari interaksi ligan dan protein target. *Binding affinity* adalah metode komputasi yang mampu memprediksi ikatan antara protein dan ligan (Rahman *et al*, 2024). Sedangkan, residu hasil interaksi antar protein atau antar protein-ligan merupakan prasyarat yang penting dalam transduksi sinyal, imunoreaksi, serta regulasi dari suatu gen. Dalam studi interaksi protein-ligan penting untuk memahami mekanisme dari regulasi biologis, dan dapat memberikan landasan teoritis untuk desain serta penemuan target obat baru (Fu *et al.*, 2018). Hasil ini bertujuan untuk mencari nilai yang paling cocok dengan reseptor target, sehingga apabila digunakan untuk modifikasi obat baru dapat memberikan efek terapeutik yang maksimal.

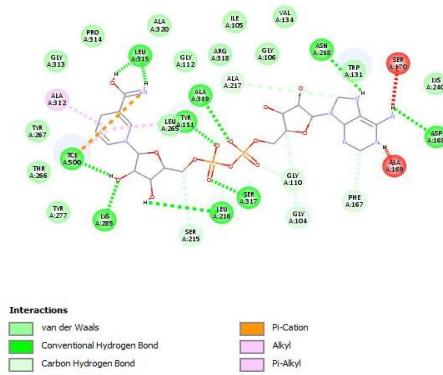
Pada analisa *molecular docking* terhadap protein PfENR, digunakan ligan natif triclosan/TCL. Triclosan adalah antimikroba yang memiliki kemampuan menghambat enzim PfENR, pada kisaran nanomolekuler yang rendah serta memiliki ADME yang menguntungkan (Weatherly & Goose, 2017). Berdasarkan hasil analisis *molecular docking* yang dilakukan terhadap protein ini, nilai *Binding affinity* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil nilai *binding affinity* proses *molecular docking* protein 1NHG

N o	Ligan	Binding Affinity (kkal/mol)
1	Triclosan/TCL (Ligan natif)	-7.45
2	Andrographolide	-6.67
3	14-deoxyandrographolide	-7.11
4	14-Deoxy-14,15-didehydroandrographolide	-6.78
5	Neoandrographolide	-10.30
6	Andrographiside	-7.22

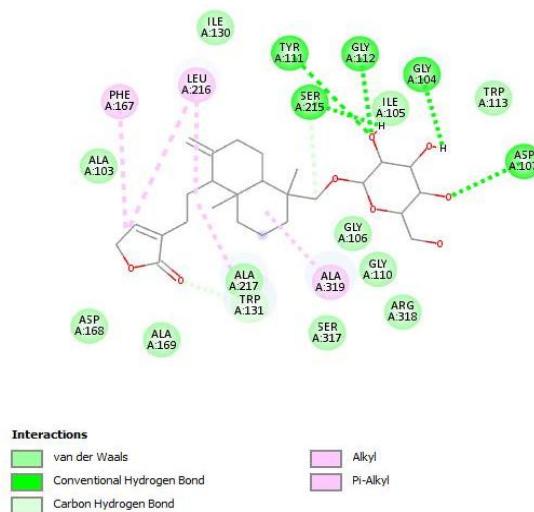
Dari hasil *molecular docking* dapat diketahui bahwa nilai *binding affinity* yang paling rendah terdapat pada ligan Neoandrographolide dengan nilai -10.30 kkal/mol. Triclosan yang merupakan ligan natif memiliki nilai *binding affinity* yang lebih tinggi dari ke 4 ligan lainnya. Afinitas antara reseptor dengan ligan lebih baik ketika nilai *binding affinity* lebih rendah, dan sebaliknya, ketika nilai *binding affinity* lebih tinggi, afinitas antara reseptor lebih rendah. (Saputri *et al*, 2016). Sehingga, nilai *binding affinity* dari ligan ke-4 yaitu Neoandrographolide memiliki afinitas yang lebih baik dibandingkan dengan triclosan dan lebih berpotensi sebagai agen anti-malaria.

Selanjutnya, hasil yang didapatkan dari *docking* protein PfENR berupa interaksi antara protein dan ligan natif adalah :



Pada visualisasi 2D ligan TCL, dimana TCL ini merupakan suatu ligan natif yang menempel pada PfENR dan dapat dilihat pada gambar 1. Terdapat 13 buah ikatan *Van der Waals* yaitu (LYS) : A240; (TRP) : A131; (VAL) : A134; (GLY) : A106; (ILE) : A105; (ARG) : A318; (GLY) : A112; (ALA) : A320; (PRO) : A314; (GLY) : A313; (TYR) : A267; (THR) : A266; (TYR) : A277. Terdapat juga 9 ikatan hidrogen yaitu (ASP) : A168; (ASN) : A218; (ALA) : A319; (TYR) : A111; (LEU) : A315; (TCL) : A500; (LYS) : A285; (LEU) : A216; (SER) : A317. Terdapat juga 8 ikatan karbon hidrogen yaitu (LYS) : A240; (TRP) : A131; (ALA) : A217; (LEU) : A265; (SER) : A215; (GLY) : A110; (GLY) : A104; dan (PHE) : A167. Terdapat juga 2 ikatan donor-donor yang tidak mendukung yaitu (SER) : A170; dan (ALA) : A169; serta 2 ikatan alkil dan p-alkil yaitu (ALA) : A312 dan (TYR) : A111.

Hasil yang didapatkan dari *docking* protein PfENR berupa interaksi antara protein dengan Neoandrographolide adalah :



Gambar 2. Interaksi Neoandrographolide dengan Protein

Pada visualisasi 2D ligan Neoandrographolide, dimana Neoandrographolide ini merupakan suatu ligan uji yang berasal dari tanaman sambiloto berinteraksi dengan PfENR dan dapat dilihat pada gambar 2. Terdapat 11 buah ikatan *Van der Waals* yaitu (TRP) : A113; (ILE) : A105; (ILE) : A130; (ALA) : A103; (ASP) : A168; (ALA) : A169; (ALA) : A217; (SER) : A317; (GLY) : A106; (GLY) : A110 dan (ARG) : A318. Terdapat juga 5 ikatan hidrogen yaitu (ASP) : A107; (GLY) : A104; (GLY) : A112; (SER) : A215; (TYR) : A111. Serta terdapat 3 ikatan alkil dan p-alkil yaitu (ALA) : A319; (LEU) : A216; (PHE) : A167.

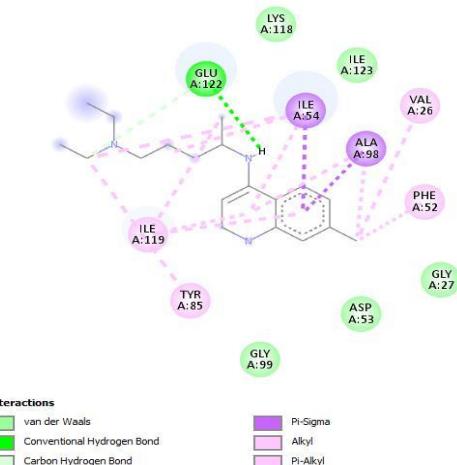
Pada analisa *molecular docking* terhadap protein PfLDH, digunakan ligan natif CLQ/Chloroquine. Chloroquine dapat menghambat enzim PfLDH yang secara langsung menargetkan jalur degradasi hemoglobin *Plasmodium* ataupun menargetkan secara langsung sistem autofag inang, sistem imun bawaan, dan sistem imun adaptif dari *plasmodium* (Coban, 2020). Berdasarkan hasil analisis *molecular docking* yang dilakukan terhadap protein ini, nilai *Binding affinity* ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil nilai *binding affinity* proses *molecular docking* Protein 1CET

N o	Ligan	Binding Affinity (kkal/mol)
1	Chloroquine	-6.04
2	Andrographolide	-5.78
3	14-deoxyandrographolide	-6.41
4	14-Deoxy-14,15-didehydroandrographolide	-5.69
5	Neoandrographolide	-6.83
6	Andrographiside	-6.16

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa terdapat senyawa yang memiliki *binding affinity* lebih rendah dibandingkan Chloroquine yaitu Andrographiside dengan nilai -6.16 kkal/mol, 14-deoxyandrographolide dengan nilai -6.41 kkal/mol, dan Neoandrographolide dengan nilai -6.83 kkal/mol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa Neoandrographolide memiliki afinitas terbaik diantara ligan lainnya dan lebih berpotensi sebagai anti-malaria.

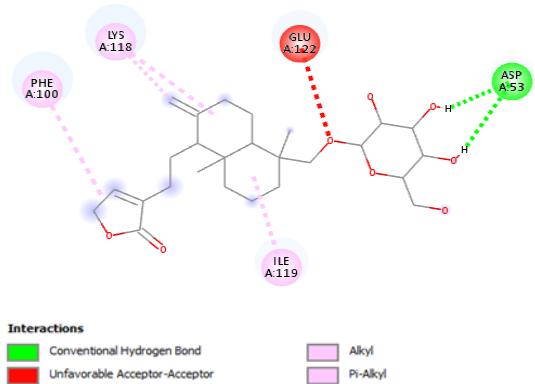
Selanjutnya, hasil yang didapatkan dari *docking* protein PfLDH berupa interaksi antara protein ini adalah :



Gambar 3. Interaksi ligan natif CLQ dengan Protein PfLDH

Pada visualisasi 2D ligan natif CLQ, dimana CLQ merupakan suatu ligan natif yang menempel pada PfLDH dan dapat dilihat pada gambar 3. Terdapat 5 ikatan *Van der Waals* yaitu pada asam amino (ILE) : A123; (LYS) : A118; (GLY) : A27; (ASP) : A53; dan (GLY) : A99. Terdapat juga sebuah ikatan hidrogen yaitu (GLU) : A122. Selain itu, terdapat 2 ikatan Pi-sigma yaitu (ILE): A54 dan (ALA) : A98 serta terdapat 4 ikatan alkil dan pi-alkil yaitu (VAL): 26; (PHE) : A52; (TYR) : A85 dan (ILE) : A119.

Adapun hasil yang didapatkan dari *docking* protein PfLDH berupa interaksi antara protein dengan Neoandrographolide adalah :



Gambar 4. Interaksi ligan Neoandrographolide dengan Protein PfLDH

Pada visualisasi 2D ligan Neoandrographolide, dimana ligan ini berinteraksi dengan PfLDH dan dapat dilihat pada gambar 4 terdapat juga dua ikatan hidrogen dimana keduanya berikatan dengan asam amino (ASP) : A53. Pada visualisasi juga terdapat 3 ikatan alkil dan pi-alkil yaitu (LYS) : A118, (PHE): A100, dan (ILE) : A119. Serta satu ikatan aseptor-aseptor yang tidak mendukung yaitu (GLU): A122.

Pada penelitian ini, menampilkan hasil residu asam amino yang digunakan untuk mengidentifikasi bagaimana ligan dan reseptor berinteraksi :

Tabel 3. Residu asam amino interaksi ligan-protein pada *Plasmodium falciparum Enoyl-ACP reductase* dan

Ligan	Ikatan Hidrogen			Interaksi Hidrofobik	Interaksi Elektrostatik
	Asam Amino	Jarak (Å)	Ligan-Asam Amino		
TCL	(TYR) : A111*	1.75681	H-O	(TYR) : A111*	-
	(LYS) : A285	1.939	H-O	(ALA) : A312**	
	(SER) : A317	1.89267	H-O		
	(ALA) : A319*	2.41707	H-O		
	(GLY) : A110	3.40569	H-O		
	(ASP) : A168	2.06245	H-O		
	(ASN) : A218	2.3868	H-O		
	(LEU) : A315	1.9212	H-O		
Neoandrogr apholide	(ASP) : A107	2.20469	H-O	(PHE) : A167	-
	(TYR) : A111*	2.66584	H-O	(ALA) : A319*	
	(GLY) : A112	2.296	H-O	(LEU) : A216	
	(GLY) : A104**	2.10073	H-O		
CLQ	(SER) : A215	3.7503	H-O		
	(GLU) : A122**	1.91195	H-O	(ILE) : A54	-
				(ALA) : A98	
				(ILE) : A119	
				(PHE) : A52**	
				(TYR) : A85**	
Neoandrogr apholide				(VAL) : A26	
	(ASP) : A53**	1.70741	H-O	(LYS) : A118	
	a			(PHE) : A100	
	pholide			(ILE) : A119*	

Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase

*: asam amino yang mirip dengan ligan natif

**: asam amino yang bertanggung jawab pada situs aktif

Pada eksperimen ini dilakukan pengujian analisis residu asam amino yang bertujuan untuk mengetahui interaksi antara ligan dan reseptor. Adapun beberapa interaksi yang dapat terjadi meliputi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, serta interaksi elektrostatik. Kemiripan yang dapat terjadi antara ligan natif dan ligan uji yaitu ikatan hidrogen dan asam amino yang berperan penting dalam interaksi (Lin & Brasseur, 1995). Asam amino tersebut seringkali dijadikan sebagai target dalam pengembangan obat baru. Selain itu, adanya peran interaksi hidrofobik serta interaksi elektrostatik juga dapat berkontribusi pada peningkatan kestabilan bentuk struktur molekul (Casini *et al.*, 2002).

Berdasarkan publikasi Perozzo *et al.* (2002), asam amino yang bertanggung jawab dalam situs aktif enzim PfENR adalah (GLY) : A104, (TYR) : A277, (MET) : A281, (LYS) : A285, (ALA) : A312, dan (PRO) : A314. Hasil penambatan pada PfENR memperlihatkan bahwa ligan natif dan ligan uji memiliki interaksi dengan situs aktif protein yang dilihat dari residu asam amino melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terjadi. Dari hasil ini pada senyawa Neoandrographolide terdapat dua ikatan yang sama dengan ligan natif Triclosan yaitu (ALA) : A319 dan (TYR) : A111. Pada senyawa ini ditemukan juga satu ikatan dengan asam amino yang bertanggung jawab pada situs aktif yaitu (GLY) : A104 dan diamati bahwa interaksi yang terjadi yaitu interaksi hidrogen.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Read *et al.*, (1999) mengenai residu asam amino yang bertanggung jawab pada situs aktif enzim PfLDH diantaranya adalah (GLU) : A122; (ASP) : A53; (GLY) : A99; (PHE) : A52 dan (TYR) : A85. Dari hasil residu asam amino yang ditunjukkan pada Tabel 3. dimana senyawa Neoandrographolide memiliki 1 ikatan yang sama dengan ligan natif CLQ yaitu (ILE) : A119.

Pada senyawa ini juga ditemukan dua ikatan dengan asam amino yang bertanggung jawab pada situs aktif yaitu (ASP) : A53 dan diamati bahwa interaksi yang terjadi yaitu interaksi hidrogen.

Selain itu, dalam pengujian ini juga dilakukan skrining Lipinski pada ligan. Pengujian ini bertujuan untuk mempermudah dalam menentukan senyawa yang memiliki permeabilitas yang baik berdasarkan absorbsinya. Berdasarkan pengujian ini, diharapkan obat dapat mencapai sel target sehingga senyawa aktif dapat berinteraksi dan memberikan efek terapeutik yang baik bagi tubuh (Macftucha *et al.*, 2022). Berikut adalah hasil prediksi pengujian Lipinski pada analisis senyawa turunan Andrographolide :

Tabel 4. Hasil skrining sifat fisikokimia senyawa Andrographolide

N o	Ligan	Berat Molekul	HBA	HBD	Log P
1	Andrographolide	350.455	5	3	1.9626
2	14-deoxyandrographolide	334.456	4	2	2.9918
3	14-Deoxy-14,15-didehydroandrographolide	332.44	4	2	2.7678
4	Neoandrographolide	480.598	8	4	1.8452
5	Andrographiside	512.596	10	6	-0.2132
6	Chloroquine	319.88	3	1	4.8106

Ket : HBA : Hydrogen Bond Acceptors; HBD : Hydrogen Bond Donors; Log P: High Lipophilicity

Menurut Lipinski *et al* (2001), senyawa yang memiliki efek terapeutik atau dapat digunakan sebagai pengobatan, harus memenuhi beberapa ketentuan yang telah ditetapkan. Pertama, massa molekul senyawa obat kurang dari 500 Dalton. Jika suatu obat memiliki massa molekul lebih dari 500 Dalton, maka senyawa obat akan mengalami kegagalan dalam proses difusi. Kedua, senyawa obat memiliki donor ikatan hidrogen (HBD) <5 dan akseptor ikatan hidrogen (HBA) <10. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat diinterpretasikan bahwa energi yang dibutuhkan berbanding lurus dengan kapasitas ikatan hidrogen agar terjadinya proses absorpsi yang optimal. Ketiga, senyawa obat harus memiliki nilai lipofilik yang berkisar antara -0,4 - 5. Nilai lipofilik atau log P diartikan sebagai koefisien kelarutan lemak atau air, sehingga semakin besar nilai log P maka senyawa akan bersifat non polar atau hidrofobik. Namun apabila tingkat hidrofobik suatu senyawa obat terlalu tinggi, maka dapat meningkatkan toksisitas pada tubuh. Hal tersebut dapat terjadi karena senyawa yang bersifat lipofilik akan terdistribusi luas dalam tubuh. Namun sebaliknya jika nilai log P terlalu rendah, maka obat akan sulit menembus membran *lipid bilayer* (Lipinski *et al.*, 2001). Berdasarkan tabel 4. dapat dilihat bahwa Neoandrographolide memenuhi persyaratan Lipinski. Pertama, berat molekul dari senyawa ini yaitu 480.598 Dalton. Kedua, nilai HBA dan HBD dari senyawa ini berturut-turut adalah 8 dan 4. Ketiga, nilai Log P dari senyawa ini yaitu 1.8452.

Simpulan

Pada penelitian ini, dilakukan penambatan pada dua protein PfENR dan PfLDH dimana kedua protein tersebut dijadikan target karena berperan penting dalam metabolisme *P. falciparum* serta tidak memiliki struktur yang sama pada tubuh manusia. Adapun senyawa terbaik dari turunan Andrographolide yang diujikan pada kedua protein adalah Neoandrographolide. Senyawa ini dinyatakan terbaik berdasarkan beberapa parameter seperti *binding energy*, kesamaan residu asam amino, kesamaan asam amino yang terlibat pada situs aktif, serta memenuhi aturan Lipinski.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Farmasi Institut Teknologi Sumatera yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Referensi

- Casini, A., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2002). Cysteine-Modifying Agents: A Possible Approach For Effective Anticancer And Antiviral Drugs. Environmental Health Perspectives, 110(Suppl. 5). <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5801>

- Christinne, N., & Amalia, E. (2023). Senyawa Peningkat Penetrasi pada Sistem Penghantaran Obat Topikal Berdasarkan Lipofilisitas Senyawa Obat. *Majalah Farmasetika*, 8(5), 386. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v8i5.47418>
- Coban, C. (2020). The host targeting effect of chloroquine in malaria. *Current Opinion in Immunology*, 66, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.co.2020.07.005>
- Frimayanti, N., Lukman, A., & Nathania, L. (2021). Studi molecular docking senyawa 1,5-benzothiazepine sebagai inhibitor dengue DEN-2 NS2B/NS3 serine protease. *Chempublish Journal*, 6(1). <https://doi.org/10.22437/chp.v6i1.12980>
- Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights Into The Molecular Mechanisms Of Protein-Ligand Interactions By Molecular Docking And Molecular Dynamics Simulation: A Case Of Oligopeptide Binding Protein. *Computational And Mathematical Methods In Medicine*, 2018. <Https://doi.Org/10.1155/2018/3502514>
- González-Sanz, M., Berzosa, P., & Norman, F. F. (2023). Updates On Malaria Epidemiology And Prevention Strategies. In *Current Infectious Disease Reports* (Vol. 25, Issue 7). <Https://doi.Org/10.1007/S11908-023-00805-9>
- Lindert, S., & McCammon, J. A. (2012). Dynamics of Plasmodium falciparum enoyl-ACP reductase and implications on drug discovery. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 21(11), 1734-1745. <Https://doi.org/10.1002/pro.2155>
- Lins, L., & Brasseur, R. (1995). The Hydrophobic Effect In Protein Folding. *The Faseb Journal*, 9(7). <Https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737462>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental And Computational Approaches To Estimate Solubility And Permeability In Drug Discovery And Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3). [Https://doi.org/10.1016/S0169-409x\(00\)00129-0](Https://doi.org/10.1016/S0169-409x(00)00129-0)
- Malau, N. D., & Azzahra, S. F. (2020). Analysis Docking Of Plasmodium Falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (Pfenr) With Organic Compounds From Virtual Screening Of Herbal Database. *Acta Chimica Asiana*, 3(1). <Https://doi.org/10.29303/aca.V3i1.14>
- Manhas, A., Patel, A., Lone, M. Y., Jha, P. K., & Jha, P. C. (2018). Identification of PfENR inhibitors: A hybrid structure-based approach in conjunction with molecular dynamics simulations. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(10), 8490–8500. <Https://doi.org/10.1002/jcb.27075>
- Maxiselly, Y. (2018). Teknik pemeliharaan tanaman kina TBM di Arjasari yang terintegrasi dengan pertanian berkelanjutan dan ramah lingkungan. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 2(7), 522-525.
- Penna-Coutinho, J., Cortopassi, W. A., Oliveira, A. A., Costa França, T. C., & Krettli, A. U. (2011). Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies. *PLoS ONE*, 6(7). <Https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021237>
- Perozzo, R., Kuo, M., Sidhu, A. B. S., Valiyaveettil, J. T., Bittman, R., Jacobs, W. R., Fidock, D. A., & Sacchettini, J. C. (2002). Structural Elucidation Of The Specificity Of The Antibacterial Agent Triclosan For Malarial Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(15). <Https://doi.org/10.1074/Jbc.M112000200>
- Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). PKCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. <Https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- Putri, P. V. P., Susanti, N. M. P., & Laksmani, N. P. L. (2019). Senyawa Kuersetin Sebagai Agen Antikanker Kolorektal Secara In Silico. *Jurnal Kimia*. <Https://doi.org/10.24843/Jchem.2019.V13.I02.P07>
- Rahman, J., Newton, M. A. H., Ali, M. E., & Sattar, A. (2024). Distance Plus Attention For Binding Affinity Prediction. *Journal Of Cheminformatics*, 16(1), 52. <Https://doi.org/10.1186/S13321-024-00844-X>

- Rahmasari, F.V., Asih, P.B.S., Dewayanti, F.K. *et al.* (2022). Drug resistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* isolates in Indonesia. *Malar J* 21, 354. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04385-2>
- Ratnani, R. D., Hartati, I., & Kurniasari, L. (2012). Potensi produksi andrographolide dari sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) melalui proses ekstraksi hidrotropi. *Momentum*, 8(1), 6-10.
- 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). <https://doi.org/10.20961/alchemy.14.2.14396.236-254>
- Saputri, K. E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D., & Santoso, B. (2016). Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina. *Chimica Et Natura Acta*, 4(1). <https://doi.org/10.24198/cna.V4.N1.10443>
- Schrader, F. C., Glinca, S., Sattler, J. M., Dahse, H. M., Afanador, G. A., Prigge, S. T., Lanzer, M., Mueller, A. K., Klebe, G., & Schlitzer, M. (2013). Novel Typeii Fatty Acid Biosynthesis (Fas II) Inhibitors As Multistage Antimalarial Agents. *Chemmedchem*, 8(3). <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200407>
- Setiawan, F. F., & Istyastono, E. P. (2015). Uji In Silico Senyawa 2,6-Dihidroksiantraquinon Sebagai Ligand Pada Reseptor Estrogen Alfa. *Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas*, 12(2).
- Shadrack, D. M., Nyandoro, S. S., Munissi, J. J. E., & Mubofu, E. B. (2016). <i>In Silico</i> Evaluation of Anti-Malaria Agents from <i>Hoslundia opposita</i> as Inhibitors of <i>Plasmodium falciparum</i> Lactate Dehydrogenase (P<i>f</i>LDH) Enzyme. *Computational Molecular Bioscience*, 06(02), 23–32. <https://doi.org/10.4236/cmb.2016.62002>
- Weatherly, L. M., & Gosse, J. A. (2017). Triclosan Exposure, Transformation, And Human Health Effects. In *Journal Of Toxicology And Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 20, Issue 8). <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1399306>