

STUDI INTERAKSI SENYAWA ALKALOID *Piper longum* (L.) DENGAN PLASMEPSIN II DALAM SKRINING OBAT ANTIMALARIA

Dwi Koko Pratoko
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Email: dwikoko.farmasi@unej.ac.id

Abstrak

Piperin, senyawa yang terkandung dalam *Piper longum* (L.) memiliki aktivitas antimalarial dengan mekanisme deregulasi *Ubiquitin Proteasome System*. 2BJU, suatu enzim Plasmepsin II dengan ligan IH4 memiliki aktivitas antimalaria dengan IC₅₀ 34nM. IH4 merupakan inhibitor Plasmepsin II yang memiliki cincin piperidin pada strukturnya yang juga dimiliki senyawa piperin dan beberapa senyawa alkaloid pada *Piper longum* (L.). Penelitian ini melakukan skrining agen antimalaria dengan melakukan penambatan molekul senyawa alkaloid yang terkandung dalam *Piper longum* (L.) terhadap enzim plasmepsin II serta melakukan studi interaksi antara ligan asli serta senyawa alkaloid dengan enzim plasmepsin II. Berdasarkan penelitian ini, didapatkan senyawa *piperundecalidine* memiliki energi paling rendah diantara senyawa alkaloid yang lain, namun tidak lebih rendah dibandingkan ligan asli dari Plasmepsin II (2BJU). Hal ini terjadi karena pada *piperundecalidine* hanya berinteraksi dengan asam amino pada 1 dari 6 binding pocket yang berperan penting dalam aktivitas antimalaria. Ligan asli Plasmepsin II, IH4, berinteraksi dengan asam amino penting pada 4 dari 6 *binding pocket*, yang menyumbangkan kestabilan ikatan lebih besar dibandingkan pada *piperundecalidine*.

Kata Kunci: Plasmepsin II, *Piper longum* (L.), Senyawa Alkaloid, antimalaria, penambatan molekul

I. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit parasit mematikan yang disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium* dengan nyamuk sebagai vektornya. Penyakit malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium* dengan nyamuk sebagai vektornya. Penyakit ini masih menjadi endemi di beberapa bagian dunia terutama di negara-negara berkembang. Berdasarkan data dari *WHO Malaria Report 2012*, pada tahun 2010, diperkirakan terjadi 219 juta kasus malaria di seluruh dunia dengan angka kematian sebanyak 660 ribu jiwa, setara dengan 2000 kematian tiap hari. Kasus malaria ini mayoritas terjadi pada anak dibawah usia 15 tahun (65%). Di Indonesia, kasus malaria pada tahun 2011 tergolong masih tinggi yaitu berkisar 700 tiap 100.000 penduduk, dengan kasus kematian antara 440-450 tiap 100.000 penduduk (WHO, 2013).

*Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development
Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

P. falciparum merupakan spesies patogen yang paling mematikan (White, 2004). Siklus hidup *P. falciparum* terdiri dari tiga tahap, yaitu pada nyamuk, hati (pre-eritrositik) dan darah (eritrositik). Tahap yang berlangsung dalam tubuh manusia adalah pada tahap hati dan darah. Pada umumnya gejala malaria muncul pada saat parasit berkembang (merozoit) dilepaskan dari hati menuju aliran darah dan menyerang sel darah merah. Di dalam sel darah merah, parasit mendegradasi hemoglobin manusia di vakuola makanan untuk menghasilkan asam amino yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan *P. falciparum* (Khan dan Waters, 2004). Pada eukariot, *Aspartic protease* dari *P. falciparum*, terlibat pada proses degradasi hemoglobin menjadi fragmen besar yang nantinya akan didegradasi lebih lanjut menjadi asam amino. Dikarenakan peran plasmepsin di atas, maka saat ini enzim tersebut menjadi target obat yang potensial dalam penemuan obat baru antimalaria (Banerjee dkk., 2002; Coombs dkk., 2001). Berdasarkan penelitian sebelumnya, telah diidentifikasi 10 jenis plasmepsin, dimana plasmepsin II merupakan isoform enzim plasmepsin terbaik yang telah diteliti (Ersmark dkk., 2006).

Berdasarkan data Bank Data Protein RCSB (www.rcsb.org), saat ini terdapat 18 struktur co-kristal X-ray dari plasmepsin II dimana 9 diantaranya merupakan struktur co-kristal yang terkompleks dengan inhibitor turunan pepstatin (1M43, 1ME6, 1SME, 1XDH, 1XE5, 1XE6, 1W6H, 1WDI, dan 2R9B), 2 struktur merupakan struktur co-kristal tanpa inhibitor (1LF4 dan 1MIQ), serta 7 struktur dengan inhibitor non pepstatin (1LEE, 1LF3, 1LF4, 2BJU, 2IGX, 2IGY dan 4CKU). 2BJU merupakan struktur plasmepsin yang terkompleks dengan inhibitor aktif yang memiliki *scaffold* cincin piperidin ($IC_{50} = 34$ nM).

Piper longum (L.) memiliki banyak aktivitas farmakologi antara lain efek kardiovaskuler, antiamuba (*Entamoeba histolytica*), antimikroba (beberapa bakteri patogen seperti *S. Tiphy*, *E. Coli*, *P. Aeroginosa*), antijamur, antiulser, antidiabetes, analgesik, antiinflamasi, antioksidan, imunomodulator, antikanker, efek terhadap saluran pernapasan, antiasma serta preventif terhadap hati (Amit Khandhar, 2010; Mun'im dan Hanani, 2011). *Piper longum* (L.) memiliki banyak kandungan senyawa fitokimia golongan alkaloid, antara lain piperine, piperidine, dan banyak senyawa lainnya. Diantara senyawa yang terdapat pada tanaman ini, banyak diantaranya merupakan senyawa alkaloid yang memiliki cincin piperidin di dalamnya. Berdasarkan *Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

penelitian sebelumnya, piperine memiliki aktivitas antimalarial dengan mekanisme deregulasi *Ubiquitin Proteasome System* (UPS) (Kundu dkk., 2015; Neto dkk., 2013).

Berdasarkan uraian diatas, maka dapat dilakukan skrining senyawa alkaloid yang terkandung dalam *Piper longum* (L.) yang memiliki cincin piperidin dalam strukturnya dengan melakukan prediksi afinitas melalui penambatan molekul terhadap 2BJU serta studi perbandingan interaksi antara ligan asli dan senyawa yang memiliki prediksi afinitas paling tinggi. Senyawa alkaloid *Piper longum* yang memiliki afinitas lebih tinggi dibandingkan senyawa aktif, maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut guna pengembangan agen antimalaria.

II. METODE PENELITIAN

A. Persiapan *Molecular Modelling*

Dalam melakukan penambatan molekul menggunakan laptop ASUS S400CA yang dioperasikan menggunakan windows 8.1, intel core i5-3317U, 64bit, DDR3 1600 MHz SDRAM 4 GB. Software yang diinstall adalah *ChemBioDraw Ultra* 13.0 free trial (www.cambridgesoft.com) untuk menggambar struktur ligan dalam 2D dan 3D serta untuk meminimalkan energi ligan. *Molegro Virtual Docker* 6.0 digunakan dalam melakukan proses penambatan molekul serta analisis interaksi antara ligan dengan enzim.

Struktur enzim 3D yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim plasmepsin II yang merupakan *aspartic protease* (PDB ID : 2BJU, resolusi 1,56 Å). Enzim tersebut diunduh dari bank data protein (PDB) (www.rcsb.org).

B. Preparasi Makromolekul

Enzim plasmepsin II diunduh dari Bank data protein (www.rcsb.org) melalui *software Molegro Virtual Docker*. Semua molekul air dihilangkan dan hanya memasukkan protein dan ligan saja. Enzim dipisahkan dari ligan aslinya dan siap untuk dilakukan proses penambatan molekul

C. Preparasi Ligan

Ligan asli serta senyawa alkaloid yang terkandung dalam *Piper longum* terpilih yang akan dilakukan penambatan molekul digambar secara 2D dan diminimalkan energinya menggunakan metode MM2 pada *ChemBioDraw Ultra* 13.0 dan disimpan dalam ekstensi file .mol2. Metode yang digunakan dalam meminimalkan energi yaitu *Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

metode *force field molecular mechanism* MM2. Penyaringan bentuk ligan yang paling stabil dikombinasikan dengan MM2 dalam pencarian konformasi ditujukan untuk menghasilkan pose ligan yang stabil dengan sisi aktif dari protein.

D. Penambatan Molekul (ligan) terhadap enzim plasmepsin II

Ligan asli dan senyawa alkaloid yang telah dipreparasi dilakukan penambatan molekul pada sisi aktif Plasmepsin II. Algoritma *Molegro virtual Docker* dalam mendeteksi tempat ikatan protein yang berpotensi sebagai sisi aktif untuk berikatan dengan ligan (obat) dengan memanfaatkan rongga (*cavity*) yang dicari. Parameter yang digunakan pada proses *docking* antara lain

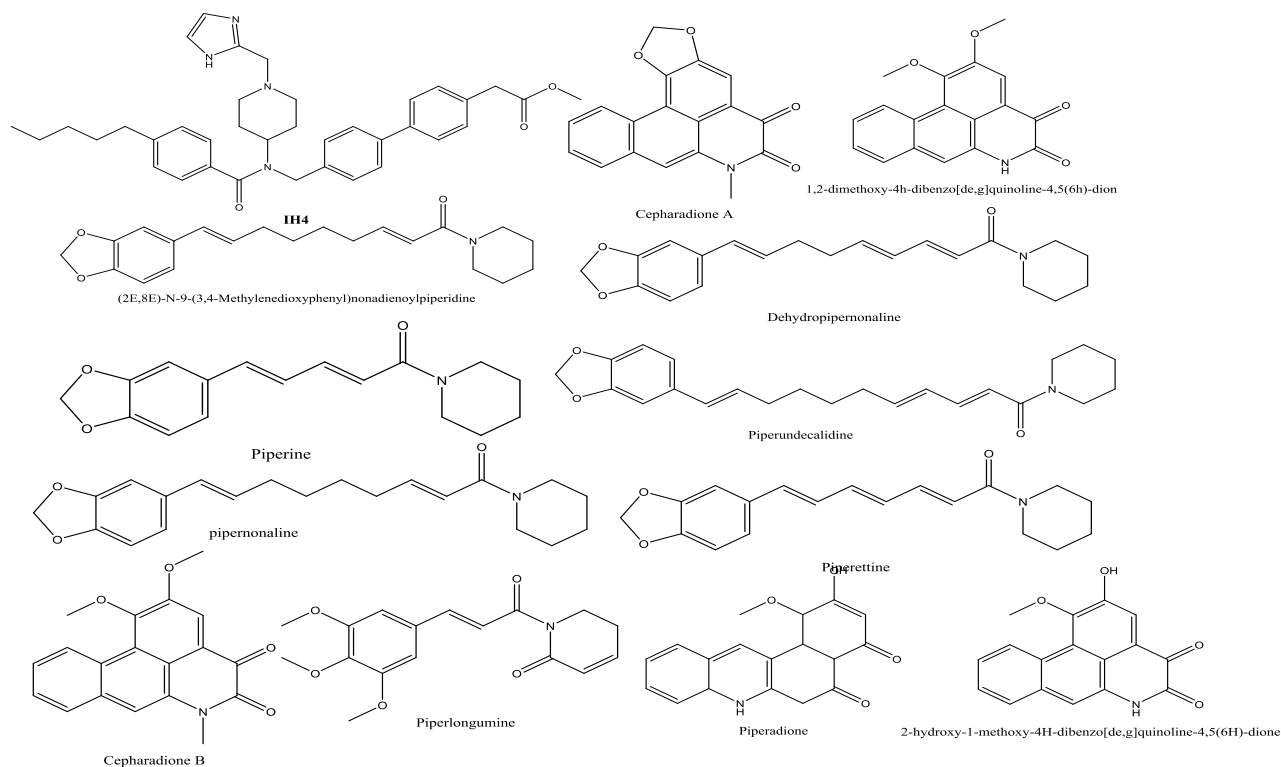
- *Score* : *MolDock Score*
- *Grid resolution* : 0,30 Å
- *Number of run algorithm* : 10
- *Max iterations* : 1500
- *Max population size* : 50
- *Energy treshold pose generation* : 100

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

IH4 merupakan ligan asli dari struktur co-kristal 2BJU yang merupakan enzim dari plasmepsin II. IH4 diekstraksi dan dilakukan penambatan ulang (*redocking*) ligan asli pada *binding site*-nya. Penambatan ulang ligan asli bertujuan untuk menentukan nilai *Root Mean Squared Deviation* (RMSD). Ligan asli dari 2BJU diekstraksi dan dimasukkan *binding site*-nya untuk menentukan kemampuan ligan dalam mereproduksi orientasi dan posisi inhibitor yang diamati pada struktur kristal di dalam *cavity*. Hasil dari penambatan ulang IH4 terhadap 2BJU mendapatkan 2 data yaitu *MolDockScore* dan RMSD. *MoldockScore* menunjukkan energi yang terlibat selama proses penambatan molekul, sedangkan RMSD merupakan deviasi antara molekul ligan dan ligan referensi. Pada penelitian ini mendapatkan nilai RMSD 1,34 Å, dimana memiliki nilai kurang dari 2 Å, nilai ini digunakan dalam mengevaluasi keberhasilan algoritma penambatan molekul (*docking*), dimana metode dikatakan valid bila RMSD dari proses penambatan molekul dengan ligan asli menghasilkan nilai <2,00 Å (Saptarini dkk., 2013). Berdasarkan hal tersebut, maka metode penambatan molekul dengan

menggunakan enzim 2BJU dapat dilakukan untuk melakukan penambatan senyawa alkaloid *Piper longum* (L.).

Pada penelitian ini dipilih 12 senyawa alkaloid yang ditemukan pada *Piper longum* yang memiliki cincin piperidin didalam strukturnya (Gambar 1). 12 senyawa ini dilakukan penambatan molekul pada 2BJU pada *cavity* dengan volume 325,15. Senyawa-senyawa tersebut digambar secara 2D dan 3D kemudian diminimalkan energinya menggunakan MM2 serta disimpan dalam bentuk *file Sybil2* (.mol2) dan dilanjutkan prosedur penambatan molekul sama seperti melakukan penambatan molekul pada ligan asli, hanya saja pada penambatan molekul senyawa alkaloid *Piper longum* (L.) tidak dilakukan penilaian RMSD. Hasil penambatan molekul dapat dilihat pada Tabel 1.



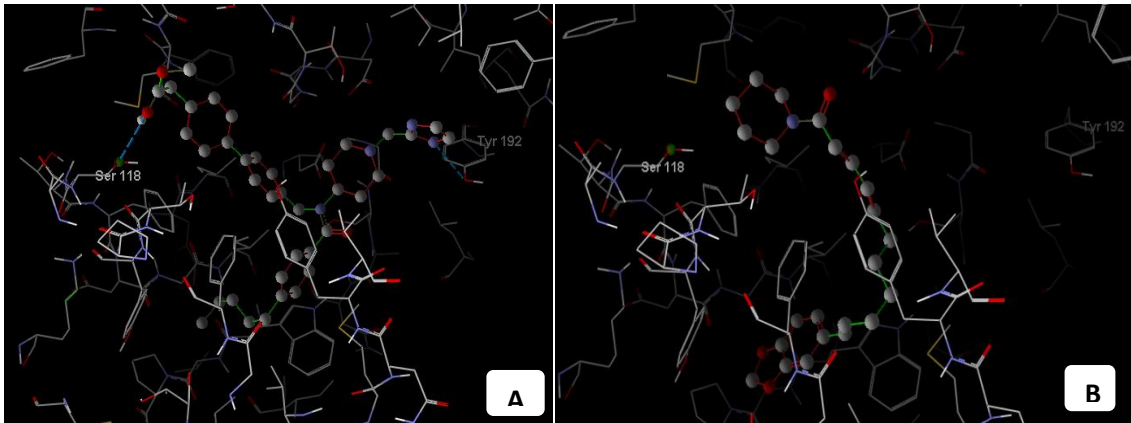
Gambar 1. Struktur senyawa IH4 dan senyawa alkaloid *Piper longum* (L.)

Tabel 1. Hasil penambatan molekul senyawa alkaloid Piper longum (L.) dengan sisiI aktifenzim Plasmepsin II

No	Nama Senyawa	MoldockScore	Torsi	HBond
1	IH4 (ligan asli)	-170,836	14	-0,526
2	<i>Piperundecalidine</i>	-143,543	8	0
3	<i>Dehydropipernonaline</i>	-143,269	6	-4,589
4	<i>Pipernonaline</i>	-138,786	7	-2,108
5	(2E,8E)-N-9-(3,4-Methylenedioxyphenyl)nonadienoylpiperidine	-136,159	7	-3,867
6	<i>Piperettine</i>	-130,110	4	0
7	<i>Piperine</i>	-121,658	3	0
8	<i>Piperlongumine</i>	-108,413	6	-2,715
9	<i>Piperadione</i>	-95,694	1	-2,790
10	<i>Cepharadione A</i>	-85,142	0	0
11	2-hydroxy-1-methoxy-4H-dibenzo[de,g]quinoline-4,5(6H)-dione	-77,403	1	-0,235
12	1,2-dimethoxy-4h-dibenzo[de,g]quinoline-4,5(6h)-dion	-71,938	2	0
13	<i>Cepharadione B</i>	-62,614	2	-0,756

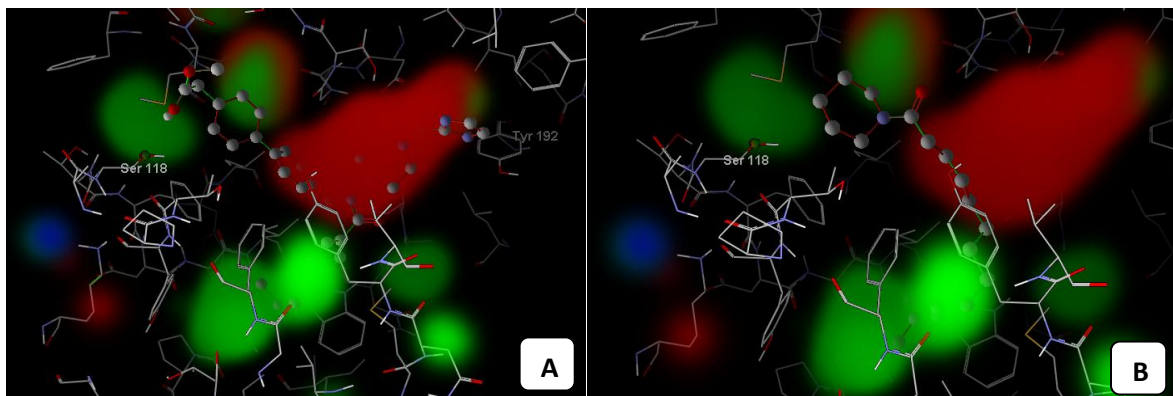
Berdasarkan data analisis hasil penambatan molekul terhadap senyawa alkaloid *Piper longum* (L.) pada 2BJU, ligan asli (IH4) memiliki nilai *MolDockScore* yang paling rendah, diikuti senyawa alkaloid *piperundecalidine*. Energi yang terlibat dalam proses penambatan molekul ini terkait afinitas ikatan ligan terhadap reseptor. Bila dibandingkan dengan IH4 yang sudah diketahui nilai IC_{50} nya, dapat diketahui bahwa energi dari semua senyawa alkaloid *Piper longum* yang diujikan memiliki energi yang lebih tinggi, hal ini menunjukkan senyawa–senyawa alkaloid tersebut memiliki afinitas yang lebih rendah dibandingkan dengan ligan asli IH4.

Berdasarkan interaksi ikatan hidrogen antara ligan asli (IH4) dengan 2BJU (Gambar 2), dapat diketahui bahwa ligan asli berikatan hidrogen dengan dua residu asam amino dari enzim plasmepsin II, yaitu dengan residu Ser118 (energi *HBond* -2,44, panjang ikatan 3,11 Å) dan Tyr192 (energi *HBond* -2,39, panjang ikatan 3,12 Å). Pada senyawa *piperundecalidine* tidak terjadi interaksi ikatan hidrogen dengan residu asam amino. Hal diatas menyebabkan interaksi antara IH4 lebih stabil dibandingkan dengan *piperundecalidine*.



Gambar 2. Interaksi ikatan hidrogen 2BJU dengan (a) ligan asli (IH4) dan (b) senyawa alkaloid *piperundecalidine*

Gambar 3 menunjukkan peta kesesuaian energi antara residu dengan ligan. Warna hijau menunjukkan bagian dari residu dimana interaksi sterik pada daerah tersebut lebih disukai, warna merah menunjukkan bagian dari residu dimana interaksi elektrostatik lebih disukai pada bagian tersebut. Bila dilihat pada peta energi, senyawa IH4 bersesuaian dengan daerah residu dimana interaksi sterik dan elektrostatik lebih disukai, sedangkan senyawa piperundecalidine hanya bersesuaian dengan daerah residu dimana interaksi sterik lebih disukai. Kesesuaian ini menyumbang kestabilan afinitas antara ligan IH4 dengan enzim.

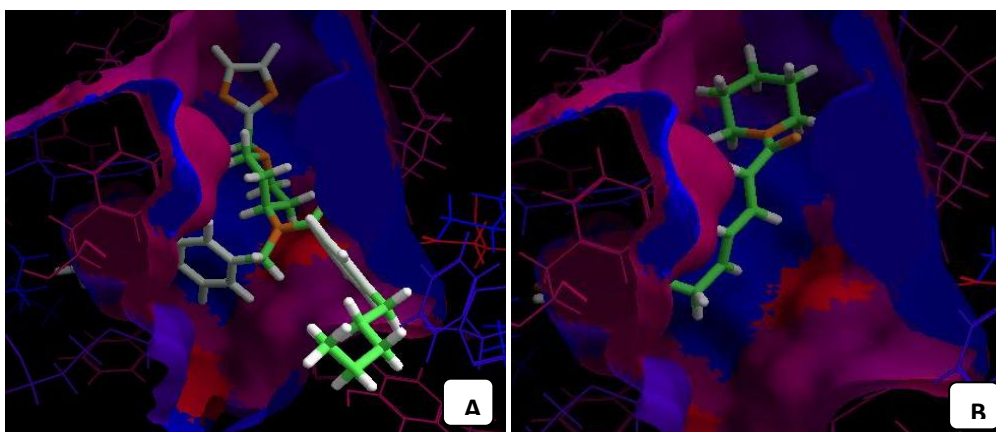


Gambar 3. Tampilan peta energi residu enzim dengan (a) IH4 dan (b) *Piperundecalidine*

Gambar 4 menunjukkan permukaan residu asam amino enzim terkait hidrofobisitas. Pada residu asam amino, warna merah menunjukkan residu bersifat hidrofil, sedangkan

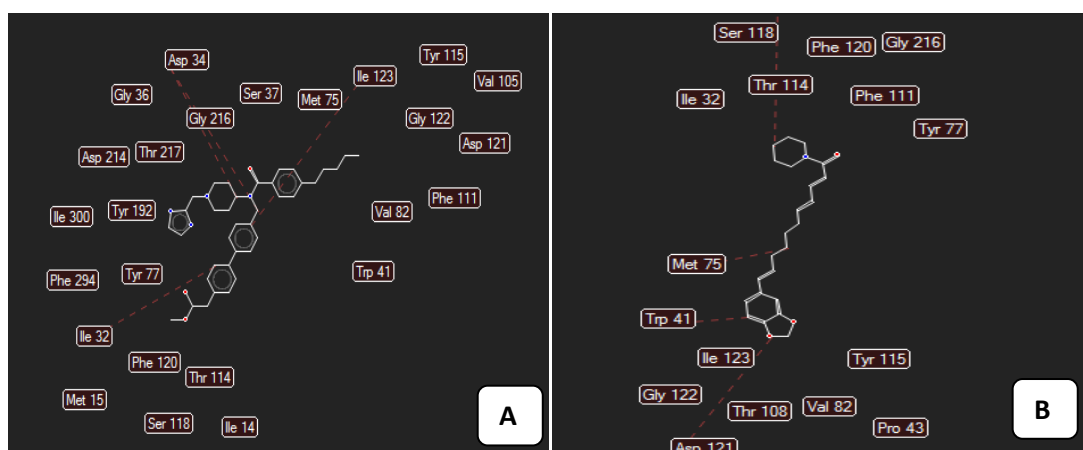
*Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development
Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

residu yang bersifat hidrofob ditandai dengan warna biru. Pada ligan yang berinteraksi di dalamnya, warna putih menunjukkan sifat atom yang netral, warna hijau menunjukkan sifat atom yang hidrofob, sedangkan warna jingga menunjukkan sifat atom yang hidrofil. Bila dilihat pada Gambar 4, senyawa IH4, rantai alkil pada IH4 bersesuaian dengan residu yang bersifat hidrofob, substituen yang mengandung ester juga bersesuaian dengan residu asam amino, substituen yang mengandung cincin piperidin bersesuaian dengan residu yang bersifat hidrofob pada cincin piperidinnya dan residu hidrofil pada cincin imidazol. Pada senyawa *piperundecalidine*, rantai alkil bersesuaian dengan residu hidrofob, sedangkan cincin piperidin sebagian besar berada pada residu hidrofob, substituen *dioxolane* berada pada daerah yang sebagian besar residu sam aminonya bersifat hidrofob. Cincin piperidin dan *dioxolane* bila dilihat kepolarannya maka cenderung kurang sesuai dengan residunya, dikarenakan kedua substituen tersebut cenderung polar, sedangkan residu asam aminonya lebih non polar. Berdasarkan uraian diatas, kesesuaian sifat hidrofobisitas antara ligan dan reseptor menyumbangkan kestabilan ikatan antara ligan dan enzim plasmepsin II.



Gambar 4. Tampilan permukaan (*surfaces*) residu berdasarkan interaksi hidrofobik dengan ligan (a) IH4 dan (b) *piperundecalidine*

Berdasarkan Gambar 5, dapat dianalisis interaksi sterik antara residu dengan ligan. Interaksi sterik disini terkait dengan ikatan Van der Waals. Berdasarkan interaksi sterik, senyawa IH4 memiliki interaksi sterik lebih kuat dengan residu-residu asam amino Ile32, Asp34 dan Ile123, sedangkan *piperundecalidine* memiliki interaksi sterik dengan residu Asp121, Trp41, Ser118, dan Met75.



Gambar 5. Interaksi sterik residu dengan ligan (a) IH4 dan (b) *piperundecalidine*

Berdasarkan struktur kristal Plasmepsin II, Brinkworth dkk. (2001) melakukan eksperimen mengenai asam amino penting yang berpengaruh dalam aktivitas antimalaria dalam *binding pocket*. *Binding pocket* dibagi menjadi beberapa daerah yang penting dalam interaksi dengan agen antimalaria. Berdasarkan asam amino tersebut bila dikaitkan dengan senyawa uji pada penelitian ini, maka dapat dilakukan analisis pada Tabel 2.

Tabel 2. Analisis Interaksi residu asam amino dengan ligan

Pocket	Asam amino	IH4	Piperundecalidine
Asp dyad	Asp214, Asp34	Asp34 (VdW)	-
Flap pocket	Pro43, Trp41, Met75, Val82, Val105, Thr108, Phe111, Ile123	Ile123 (VdW)	Trp41 (VdW), Met75
S1/S3	Ile14, Met15, Phe16, Tyr17, Ile32, Phe111, Thr114, Phe120, Ile123, Ser215, Gly216, Thr217, Ser218	Ile123 (VdW) Ile32 (VdW)	-
S2	Ala219, Pro243, Phe244, Leu271, Tyr273, Met286, Asn288, Ile289, Ile290	-	-
S1'	Tyr192, Trp193, Ile212, Phe294, Ile300	Tyr192 (Hbond)	-
S2'	Ala38, Asn39, Leu131, Ser132, Ile133	-	-

Berdasarkan hasil penambatan molekul, analisis interaksi ikatan hidrogen, hidrofobisitas, elektrostatik dan sterik, maka senyawa alkaloid yang diujikan pada penelitian ini memiliki afinitas lebih rendah dibandingkan ligan asli. Hal tersebut diperkuat dengan analisis intraksi dengan asam amino, dimana substituen yang menempati *binding pocket* yang berperan penting dalam aktivitas antimalaria sangat minim (1 *binding pocket*) bila dibandingkan dengan ligan asli yang menempati 4 dari 6 *binding pocket*.

IV. KESIMPULAN

Tujuan utama penelitian ini adalah untuk menskrining senyawa alkaloid *Piper longum* (L.) yang dapat dikembangkan sebagai agen antimalarial baru, beserta menganalisis interaksi antara enzim dengan ligan dan senyawa uji, terkait mekanisme molekuler antimalaria. Berdasarkan hasil skrining, diantara senyawa alkaloid yang diujikan, belum ada satupun senyawa yang memiliki afinitas lebih baik dibandingkan ligan asli, hal ini dimungkinkan karena minimnya interaksi antara ligan alkaloid dengan binding pocket, dimana ligan hanya berinteraksi dengan asam amino penting pada *binding pocket* hanya pada 1 tempat. Hal ini berbeda pada ligan asli, dimana berinteraksi dengan asam amino penting pada empat *binding pocket*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amit Khandhar, S. P., 2010, Chemistry and Pharmacology of *Piper longum* L., International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 5: 67–76
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., dan Goldberg, D. E., 2002, Four Plasmeprins are Active in the *Plasmodium falciparum* Food Vacuole, Including a Protease with an Active-site Histidine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 990–995
- Brinkworth, R. I., Prociv, P., Loukas, A., dan Brindley, P. J., 2001, Hemoglobin-Degrading, Aspartic Proteases of Blood-Feeding Parasites: Substrate Specificity Revealed by Homology Models, The Journal of Biological Chemistry, 276: 38844-38851
- Coombs, G. H., Goldberg, D. E., Klemba, M., Berry, C., Kay, J., dan Mottram, J. C., 2001, Aspartic Proteases of *Plasmodium Falciparum* and Other Parasitic Protozoa as Drug Targets. Trends in Parasitology, 17: 532–537

- Ersmark, K., Samuelsson, B., dan Hallberg, A., 2006, Plasmeppsins as Potential Targets for New Antimalarial Therapy, *Medicinal Research Reviews*, 26: 626–666.
- Khan, S. M., dan Waters, A. P., 2004, Malaria Parasite Transmission Stages: an Update, *Trends in Parasitology*, 20: 575–580
- Kundu, C. N., Das, S., Nayak, A., Satapathy, S. R., Das, D., dan Siddharth, S., 2015, Anti-malarials are Anti-Cancers and Vice Versa-One Arrow Two Sparrows, *Acta Tropica*, 149: 113–127
- Mun'im, A. dan Hanani, E., 2011, *Fitoterapi Dasar*, Jakarta: Dian Rakyat
- Neto, Z., Machado, M., Lindeza, A., Rosá, D., Rio, V., lio, dkk., 2013, Treatment of *Plasmodium chabaudi* Parasites with Curcumin in Combination with Antimalarial Drugs: Drug Interactions and Implications on the Ubiquitin/Proteasome System, Treatment of *Plasmodium chabaudi* Parasites with Curcumin in Combination with Antimalarial Drugs: Drug Interactions and Implications on the Ubiquitin/Proteasome System, *Journal of Parasitology Research*, *Journal of Parasitology Research*, 2013: e429736
- Saptarini, N. M., Sitorus, E. Y., dan Levita, J., 2013, Structure-Based in Silico Study of 6-Gingerol, 6-Ghogaol, and 6-Paradol, Active Compounds of Ginger (*Zingiber officinale*) as COX-2 Inhibitors. *International Journal of Chemistry*, 5: 12
- White, N. J., 2004, Antimalarial Drug Resistance, *Journal of Clinical Investigation*, 113: 1084–1092
- WHO, 2013, *World Malaria Report 2012*, Geneva: World Health Organization