

**Potensi Anthelmintik *Moringa Oleifera* Sebagai Inhibitor
Mitochondrial Rhodoquinol-Fumarate Reductase Dari *Ascaris Suum*
Menggunakan Metode Docking**

**Anthelmintic Potential Of *Moringa Oleifera* As Inhibitor Mitochondrial
Rhodoquinol-Fumarate Reductase From *Ascaris Suum* Using The
Docking Method**

Dede Rival Novian^{1*}

¹Departemen Anatomi,
Fisiologi, Farmakologi dan
Biokimia Fakultas
Kedokteran Hewan
Universitas Nusa Cendana,
Kupang, NTT 85001

Submitted: 23-09-2019

Revised: 05-10-2019

Accepted: 09-12-2019

*Corresponding author
Dede Rival Novian

Email:
dede.rival.novian@gmail.com

ABSTRAK

Salah satu nematoda parasit yang dapat menyebabkan kekurangan gizi dan bahkan kematian pada manusia adalah *Ascaris suum*. Parasit tersebut dapat bertahan hidup di sel inangnya dengan cara melakukan metabolisme menggunakan enzim fumarat reduktase. Dengan metabolisme tersebut, parasit dapat menghasilkan energi untuk bertahan hidup di sel inangnya. Rhodoquinone (RQ) di dalam metabolisme parasit berperan membantu reaksi fumarat reduktase, dan jika enzim tersebut terganggu maka energi dari metabolisme parasit tersebut tidak akan dihasilkan. Dengan demikian Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase dapat menjadi target reseptor obat anthelmintik yang baik. Hasil dari investigasi dengan menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo* dilaporkan bahwa *Moringa oleifera* memiliki berbagai fungsi obat diantaranya sebagai antiinflamasi, antimikroba, antidiabetes, antioksidan, anti tumor, anti kanker, dan anti klastogenik. Namun, potensi obat *Moringa oleifera* terhadap anthelmintik belum diteliti lebih jauh. Metode penelitian yang digunakan untuk mencari potensi anthelmintik *Moringa oleifera* sebagai inhibitor Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase *Ascaris suum* adalah simulasi docking. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi senyawa bioaktif *Moringa oleifera* terhadap reseptor anthelmintik Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase menggunakan model simulasi docking agar waktu penelitian berjalan efisien dan efektif. Hasil penelitian menunjukkan senyawa bioaktif 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol dari *Moringa oleifera* memiliki potensi sebagai senyawa obat anthelmintik baru, aktivitas 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol memiliki energi afinitas sebesar -7,0 kcal/mol dan memiliki sifat fisikokimia yang tidak bertentangan dengan aturan senyawa obat dari Lipinski.

Kata Kunci: Molecular docking, Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase, *Moringa oleifera*, *Ascaris suum*

ABSTRACT

One of the parasitic nematodes that can cause malnutrition, even death in humans, is *Ascaris suum*. The parasite can survive in its host cell by metabolizing using the *fumarate reductase* enzyme. With this metabolism, the parasite can produce energy to survive in its host cell. Rhodoquinone (RQ) plays a part in helping the fumarate reductase reaction in parasite metabolism, and energy from metabolism was not produced when the enzyme was disrupted. Thus *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* can be a good target of anthelmintic drug receptors. The results of investigations using *in vitro* and *in vivo* methods showed that *Moringa oleifera* has various medicinal functions including anti-inflammatory, antimicrobial, antidiabetic, antioxidant, anti-tumour, anti-cancer, and anti-clastogenic properties. However, the potential of the drug *Moringa oleifera* against anthelmintics has not been further investigated. Simulation *docking* is the research method used to find the anthelmintic potential of *Moringa oleifera* as the *Ascaris suum* inhibitor of *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase*. This study aims to examine the potency of *Moringa oleifera* bioactive compounds on the anthelmintic receptor *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* by using efficient and effective research time with the *docking* simulation model. The results showed the bioactive compound 3,5-bis (1,1-dimethylethyl) -phenol from *Moringa oleifera* had potential as a new anthelmintic drug compound, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl) -phenol activity had affinity energy of - 7.0 kcal / mol and has physicochemical properties that are not contrary to the rules of the drug compounds from Lipinski.

Keywords: *Molecular docking, Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase, Moringa oleifera, Ascaris suum*

1. PENDAHULUAN

Salah satu nematoda parasit yang dapat menyebabkan kekurangan gizi, bahkan kematian pada manusia adalah *Ascaris suum* (Hewitson & Maizels, 2014). Metabolisme parasit menggunakan enzim *Fumarat reductase*. Dengan metabolisme tersebut, parasit dapat menghasilkan energi untuk bertahan hidup di sel inangnya. Metabolisme parasit terjadi di sel mitokondria. *Rhodoquinone* (RQ) berperan membantu reaksi enzim *Fumarat reductase*, jika enzim tersebut terganggu maka energi dari metabolisme parasit tidak akan dihasilkan (Sakai, *et al.* 2012). Kompleks enzim yang membantu proses metabolisme parasit adalah *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase*. Oleh karena itu, enzim *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* dapat menjadi target reseptor obat anthelmintik yang baik.

Dewasa ini, ekstrak tanaman banyak digunakan sebagai obat herbal oleh lebih dari tiga perempat populasi manusia di dunia. Selain itu, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) melaporkan bahwa lebih dari 30% dari semua spesies tanaman pernah digunakan untuk tujuan pengobatan (Pathare & Wagh, 2012). Studi ilmiah tentang tanaman obat tradisional

sangat penting bagi kesehatan manusia. Oleh karena itu, mengidentifikasi dan memprediksi sifat farmakologi dari aktivitas tanaman obat tradisional wajib dilakukan untuk tujuan memodernisasi penggunaan obat secara tepat (Koutsoukas, *et al.* 2011). Kondisi yang lain, senyawa aktif dari tanaman obat tradisional tersebut sangat kompleks dan beragam, sehingga dalam mempelajarinya membutuhkan metodologi yang tepat.

Model lama penelitian tanaman obat tradisional adalah ekstraksi senyawa aktif, identifikasi kualitatif dan kuantitatif senyawa aktif (metode *in vitro*) dan yang terakhir percobaan farmakologi dengan metode *in vitro* (Zhang, *et al.* 2017). Secara umum, seluruh proses penelitian dengan metode *in vitro* dan *in vivo* memakan waktu yang lama dan membutuhkan biaya yang mahal. Namun, beberapa bagian dari pendekatan umum tersebut dapat dimodifikasi untuk meningkatkan efisiensi. Saat ini, di Nusa Tenggara Timur tanaman obat khas lahan kering dan kepulauan yang paling banyak digunakan adalah tanaman kelor (*Moringa oleifera*) (Gambar 1).



Gambar 1. Tanaman *Moringa oleifera*

Moringa oleifera adalah salah satu jenis sayuran dari golongan *Moringaceae* (Mahmood, Mugal, & Haq, 2010). *Moringa oleifera* banyak ditemukan di daerah Nusa Tenggara timur, secara tradisional, selain menjadi sayuran, juga digunakan untuk obat herbal. *Moringa oleifera* ini bahkan disebut pohon ajaib karena karena kemampuan penyembuhannya yang luar biasa untuk berbagai jenis penyakit kronis. Oleh Karena itu, *Moringa oleifera* ini dikenal sebagai fitomedisin. Hasil dari investigasi dengan menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo* dilaporkan bahwa *Moringa oleifera* memiliki berbagai fungsi obat diantaranya sebagai antiinflamasi (Mbikay, 2012), antimikroba (Moyo, 2012), antidiabetes (Tende, Ezekiel, & Dikko, 2011), antioksidan (Qwele *et al.* 2013), antikanker (Shaban *et al.* 2012), antiklastogenik (Promkum, Kupradinun, Tuntipopipat, & Butryee, 2010). Namun, potensi obat *Moringa oleifera* terhadap reseptor anthelmintik *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* belum diteliti lebih jauh. Beberapa penelitian *in vitro* *Moringa oleifera* terhadap anthelmintik menggunakan kontrol positif *albendazole* (Cabardo & Portugaliza, 2017) belum spesifik terhadap reseptor anthelmintik. Hasil studi anthelmintik (Shiomi, 2006) menyebutkan bahwa atpenin dapat menghambat kerja enzim *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase*. Oleh sebab itu, dalam penelitian ini senyawa atpenin akan digunakan sebagai kontrol positif obat. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi

senyawa bioaktif *Moringa oleifera* terhadap reseptor anthelmintik *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* dari *Ascaris suum* dengan kode *protein data bank* (PDB: 3VRA), menggunakan model simulasi *docking* agar waktu penelitian yang digunakan lebih efisien dan efektif.

2. METODE

Preparasi Struktur Makromolekul dan Ligan

Proses preparasi struktur makromolekul dan ligan dilakukan melalui pencarian, pengunduhan, dan optimasi struktur. Pencarian struktur makromolekul reseptor anthelmintik *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* dari *Ascaris suum* menggunakan halaman web *protein data bank* (<https://www.rcsb.org/>). Struktur makromolekul tersebut diunduh menggunakan format *pdb*. Sedangkan pencarian struktur ligan menggunakan *Database Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), dan diunduh diunduh dalam format *sdf*. Ada enam ligan dari senyawa bioaktif yang digunakan yaitu, *1-Hexadecanol*, *3-4-epoxy-ethanon*, *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol*, *9-octadecenamide*, *14-methyl-8-hexadecenal*, *Phytol* dan *Oleic acid*. Sedangkan ligan yang berfungsi sebagai kontrol positif yang digunakan adalah atpenin. Selanjutnya struktur dari makromolekul dan ligan tersebut dioptimasi agar dapat berjalan optimal ketika dilakukan simulasi *docking*.

Optimalisasi struktur yang dilakukan ada tiga tahapan. Tahap pertama optimalisasi struktur dari makromolekul. tahap ini dilakukan dengan memisahkan residu protein dari pengotor. Pengotor yang dibuang adalah air, dan ligan selain atpenin. Pengotor tersebut dipisahkan dari residu protein karena tidak terlibat dalam simulasi *docking*. Tahap kedua optimalisasi struktur ligan dilakukan dengan cara merubah format dari *sdf* menjadi *pdb* menggunakan program *MarvinSketch V15.8* (Volford, 2015). Selanjutnya format *pdb* diubah menjadi *pdbqt* menggunakan program *Autodock Tools 1.5.6* (*The Scripps Research Institute*). Perubahan format file ini dilakukan karena simulasi *docking* menggunakan program *Autodock Vina* dapat berjalan baik jika struktur ligan dalam format *pdbqt*. Optimalisasi Tahap ketiga adalah penentuan koordinat *binding site*. Koordinat yang digunakan untuk simulasi ada tiga sumbu, sumbu x sebesar 70 Å, sumbu y sebesar -2 Å, dan sumbu z sebesar -91 Å. koordinat *binding site* ini sebagai tempat terjadinya interaksi antara reseptor dengan senyawa obat.

Ada dua jenis ligan yang digunakan untuk *docking*, yaitu senyawa bioaktif dari *Moringa oleifera* tersedia dalam *Database PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan senyawa obat komersial atpenin (Kontrol positif) yang diperoleh dari studi literatur mengenai obat anthelmintik dan tersedia dalam *Database PubChem* (Yanuar, Pratiwi, & Syahdi, 2018).

Simulasi *Molecular Docking*

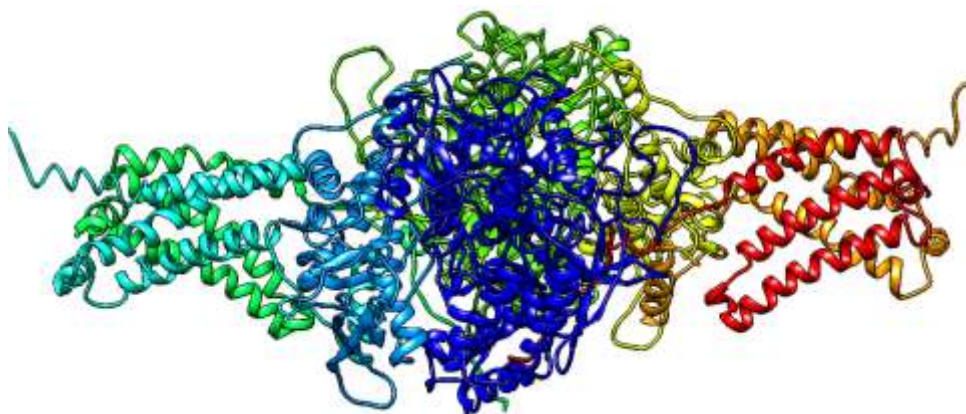
Simulasi *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan *AutoDock Vina*. Koordinat dari *binding site* dan ukuran *gridbox* menggunakan nilai dari hasil *redocking* kristal dari enzim *Mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase* (PDB ID: 3VRA). Simulasi *molecular docking* pada program *AutoDock Vina* (*The Scripps Research Institute*) menggunakan nilai *exhaustiveness* 30 agar simulasi berjalan homogen (Yanuar *et al.* 2018).

Simulasi *docking* digunakan mencari kandidat ligan terbaik pada koordinat *binding site* yang dipilih. Koordinat *binding site* digunakan sebagai tempat interaksi antara semua senyawa bioaktif potensial dan senyawa obat dengan reseptor 3VRA. Selanjutnya Autodock Vina menghitung energi afinitas antara konformasi reseptor dan ligan tersebut. Kemudian hasil Autodock Vina berupa energi afinitas dibandingkan dengan energi dari senyawa kontrol positif. Semakin kecil nilai energi afinitasnya maka senyawa bioaktif tersebut semakin stabil dan berpotensi menjadi senyawa obat.

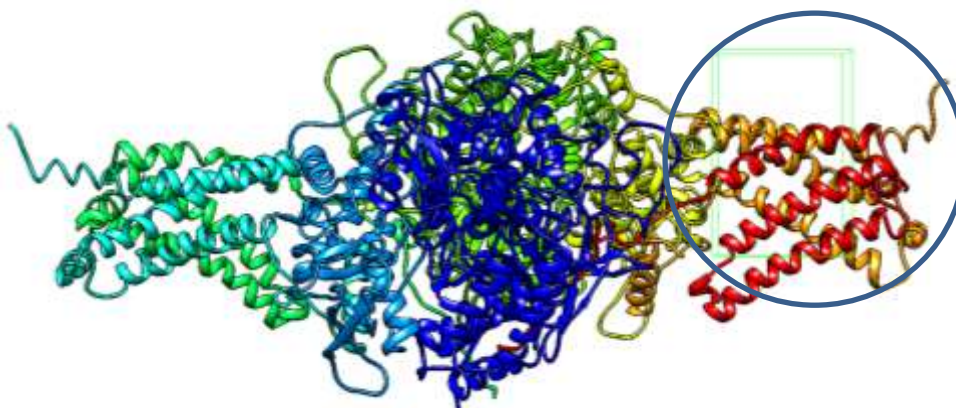
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Struktur Makromolekul dan Ligan

Struktur enzim 3VRA sebelum simulasi ditunjukkan oleh Gambar 2. Enzim 3VRA memiliki delapan ligan dan hanya satu ligan yang digunakan untuk simulasi *molecular docking* yaitu atpenin. Ketujuh ligan 3VRA yaitu SF4, F3S, MLI, FAD, FES, EFH dan HEM dibuang karena tidak digunakan dalam simulasi. Apabila ketujuh ligan tersebut tidak dibuang maka akan mengganggu interaksi antara ligan dan reseptor, karena ketujuh ligan tersebut juga akan berinteraksi dengan residu dari protein 3VRA. Selain tujuh ligan tersebut, senyawa air juga dihilangkan dari struktur 3VRA karena tidak ikut berinteraksi dengan ligan *Moringa oleifera*. Setelah dihilangkan pengotornya, kemudian ditentukan koordinat *binding site* antara ligan dengan protein (Gambar 3), koordinat yang digunakan untuk simulasi adalah sumbu x sebesar 70 Å, sumbu y sebesar -2 Å, dan sumbu z sebesar -91 Å. Koordinat *binding site* adalah penting untuk simulasi *molecular docking*, karena di *binding site* tersebut senyawa bioaktif ligan dari tanaman *Moringa oleifera* dapat berinteraksi dengan enzim 3VRA. koordinat *binding site* enzim adalah lingkaran biru yang terdapat pada Gambar 3.



Gambar 2. Struktur enzim 3VRA sebelum simulasi *docking*



Gambar 3. Situs aktif pengikatan antara ligan dengan reseptor 3VRA. Gridbox yang menjadi binding site ditunjukkan oleh lingkaran biru

Simulasi Molecular Docking

Hasil interaksi antara enzim 3VRA dengan ligan dari tanaman *Moringa oleifera* menghasilkan energi afinitas (Tabel 1). Ligan terdiri dari senyawa kontrol positif (atpenin) sebagai acuan skor, dan senyawa bioaktif dari *Moringa oleifera*: 1-Hexadecanol, 3-4-epoxy-ethanon, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 9-octadecenamide, 14-methyl-8-hexadecenal, Phytol dan Oleic acid. Berdasarkan Tabel 1, energi senyawa bioaktif 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol memiliki nilai paling rendah -7,0 kcal/mol, mendekati nilai energi dari senyawa kontrol positif (atpenin) -7,6 kcal/mol. Interaksi ligan reseptor semakin stabil jika energi afinitasnya semakin rendah.

Tabel 1. Energi Bebas Ligan-Reseptor

Ligan	Afinitas (kcal/mol)
<i>Atpenin</i> *	-7,6
<i>1-Hexadecanol</i>	-5,3
<i>3-4-epoxy-ethanone</i>	-4,9
<i>3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol</i>	-7,0
<i>9-octadecenamide</i>	-5,9
<i>14-methyl-8-hexadecenal</i>	-5,6
<i>Phytol</i>	-5,7
<i>Oleic acid</i>	-5,0

*senyawa kontrol positif

Dengan demikian, berdasarkan interaksi ligan reseptor pada Tabel 1, senyawa *bioaktif 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* dapat digunakan sebagai kandidat senyawa obat anthelmintik untuk parasit *Ascaris suum*. Selain itu, senyawa *bioaktif 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* dengan rumus molekul C₁₄H₂₂O memiliki sifat fisikokimia yang ditunjukkan oleh Tabel 2. Data Tabel 2 diperoleh dari halaman web FAFDrugs4 (<http://fafdrugs4.mti.univ-paris-diderot.fr/>) (Lagorce, Bouslama, Becot, Miteva, & Villoutreix, 2017)

Tabel 2. Sifat Fisikokimia Senyawa bioaktif 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol

Sifat Fisikokimia	Nilai
Berat Molekul*	206,32 g/mol
LogP*	4,64
Jumlah Donor Ikatan Hidrogen*	1
Jumlah Penerima Ikatan Hidrogen*	1

*memenuhi aturan Lipinski

Menurut Lipinski senyawa obat yang baik memiliki berat molekul kurang dari 500g/mol, Koefisien partisi oktanol-air (LogP) tidak lebih dari 5, jumlah donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5, dan jumlah penerima ikatan hydrogen tidak lebih dari 10 (Lipinski, 2004). Senyawa bioaktif *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* memiliki berat molekul 206,32 g/mol, LogP 4,64 dan jumlah donor dan penerima ikatan hidrogen masing - masing adalah 1. Dengan demikian senyawa bioaktif *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* memenuhi aturan senyawa obat dari Lipinski. Berdasarkan analisis dari Tabel 1 dan 2, senyawa bioaktif *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* berpotensi menjadi senyawa obat anthelmintik. Namun demikian, penelitian ini memerlukan tahap uji lanjut *in vitro* maupun *in vivo* sebagai langkah validasi anthelmintik dari *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol*.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji *molecular docking*, senyawa bioaktif *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* dari *Moringa oleifera* memiliki potensi sebagai senyawa obat anthelmintik baru, aktivitas *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol* memiliki energi afinitas sebesar -7,0 kcal/mol, dan memiliki sifat fisikokimia yang tidak bertentangan dengan aturan senyawa obat dari Lipinski. Penelitian ini memerlukan tahap uji lanjut *in vitro* maupun *in vivo* sebagai langkah validasi anthelmintik dari senyawa bioaktif *3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol*.

5. CONFLICT OF INTEREST

The author declares that there no competing conflicts of interest.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Cabardo, D. E., & Portugaliza, H. P. (2017). Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.001>
- Hewitson, J. P., & Maizels, R. M. (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.893195>
- Koutsoukas, A., Simms, B., Kirchmair, J., Bond, P. J., Whitmore, A. V., Zimmer, S., ... Bender, A. (2011). From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.011>
- Lagorce, D., Bouslama, L., Becot, J., Miteva, M. A., & Villoutreix, B. O. (2017). FAF-Drugs4: Free ADME-tox filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx491>
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Mahmood, K. T., Mugal, T., & Haq, I. U. (2010). *Moringa oleifera*: A natural gift-a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.
- Mbikay, M. (2012). Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: A review. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00024>
- Moyo. (2012). Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. *African Journal Of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/ajb10.686>
- Pathare, Y. S., & Wagh, V. D. (2012). Herbal medicines and nutritional supplements used in the treatment of glaucoma: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
- Promkum, C., Kupradinun, P., Tuntipopipat, S., & Butryee, C. (2010). Nutritive evaluation and effect of *Moringa oleifera* pod on clastogenic potential in the mouse. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.
- Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S. O., Moyo, B., Masika, P. J., & Muchenje, V. (2013). Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with *Moringa (Moringa oleifera)* leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.009>
- Sakai, C., Tomitsuka, E., Esumi, H., Harada, S., & Kita, K. (2012). Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: From parasites to cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.12.013>
- Shaban, A., Mishra, G. M., Nautiyal, R., Srivastava, S., Tripathi, K., Chaudhary, P., & Verma, S. K. (2012). In vitro cytotoxicity of *Moringa oleifera* against different human cancer cell lines. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*.
- Shiomi, K. (2006). Studies of anthelmintic and insecticide antibiotics. *The Japanese Journal of Antibiotics*.
- Ten de, J.A., Ezekiel, I., Dikko, A.A.U., and Goji, A.D.T. (2011). Effect of Ethanolic Leaves Extract of *Moringa oleifera* on Blood Glucose Levels of Streptozocin-Induced Diabetics and Normoglycemic Wistar Rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*
- Volford, A. (2015). MarvinSketch. *Chem Axon MarvinSketch*.
- Yanuar, A., Pratiwi, I., & Syahdi, R. R. (2018). In silico activity analysis of saponins and 2, 5-piperazinedione from marine organism against murine double minute-2 inhibitor and procaspase-3 activator. *Journal of Young Pharmacists*. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.2s.4>

Zhang, X., Zheng, W., Wang, T., Ren, P., Wang, F., Ma, X., ... Huang, X. (2017). Danshen-Chuanxiong-Honghua. Ameliorates cerebral impairment and improves spatial cognitive deficits after transient focal ischemia and identification of active compounds. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00452>.