

**STUDI *IN SILICO* SENYAWA - SENYAWA DALAM BUNGA TAPAK DARA
(*Catharanthus roseus*) SEBAGAI ANTIDIABETES MELALUI PENGHAMBATAN
ENZIM *ALDOSE REDUCTASE***

**Frisca Fernanda*, Alicia Christy, Nada S.M. Sugianto , Humaira P. Dewi, Joseph F. Anggi,
Agus Rusdin, Harsoning T. Mardisanutomo, Muchtaridi**

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363
frisca21001@mail.unpad.ac.id
diserahkan 13/06/2023, diterima 29/07/2023

ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan penyakit yang marak dijumpai di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Tapak dara (*Catharanthus roseus*) merupakan tanaman endemik yang berasal dari Madagaskar. Penggunaan tapak dara sebagai bahan baku obat diabetes sebelumnya telah diteliti, dimana berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, bunga tapak dara memiliki kandungan yang dapat menghambat *aldose reductase*, salah satu enzim yang berperan menyebabkan terjadinya penyakit diabetes melitus. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi interaksi senyawa - senyawa tertentu yang terdapat dalam bunga tapak dara terhadap enzim *aldose reductase*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, tidak ditemukan senyawa yang dapat mereplikasi ikatan yang dimiliki oleh reseptor dengan ligan alami maupun ikatan antara reseptor dengan kontrol positif zopolrestat. Namun dikarenakan penelitian ini bersifat terbatas terhadap 10 senyawa yang dipilih, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat senyawa dalam bunga tapak dara yang memiliki aktivitas terhadap enzim *aldose reductase*.

Kata Kunci: *aldose reductase, Catharanthus roseus, in silico, diabetes*

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a well known disease all around the world, including Indonesia. Madagascar Periwinkle (Catharanthus roseus) is an endemic plant from Madagascar. Studies on the use of madagascar periwinkle as a raw component in diabetic drugs that has been done in the past, show that the madagascar periwinkle has the ability to inhibit aldose reductase. This enzyme is one of the enzymes responsible for diabetes mellitus. This study was done to predict the interaction between certain compounds existing in the madagascar periwinkle plant against aldose reductase. Based on the study that was done, there weren't any compounds that could replicate the bond between the receptor and the natural ligand nor the bond between the receptor and the positive control (zopolrestat). Because of the limitation in this study which only includes 10 compounds, it is necessary to do further studies to discover if there are any compounds in madagascar periwinkle that have any activity towards aldose reductase.

Keywords: aldose reductase, Catharanthus roseus, in silico, diabetes

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita diabetes melitus paling banyak di Asia Tenggara. Berdasarkan laporan *International Diabetes Federation* (IDF), jumlah penderita diabetes melitus di dalam negeri sebanyak 41.813 orang pada 2022 (IDF, 2022).

Sebanyak 26.781 orang penderita diabetes melitus di Indonesia berada di rentang usia 20-59 tahun. Sebanyak 13.311 penderita diabetes melitus di Indonesia berusia di bawah 20 tahun. Sedangkan, 1.721 penderita penyakit ini berusia di atas 60 tahun (IDF, 2022).

Pada penyakit diabetes melitus, salah satu enzim yang berperan adalah enzim *aldose reductase* dimana enzim ini berperan penting dalam *polyol pathway*. Enzim *aldose reductase* inilah yang menjadi protein target pada studi ini. *Polyol pathway* merupakan jalur yang dapat mengkatalisis reduksi yang bergantung pada *nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate* yang mengubah glukosa menjadi sorbitol, yang kemudian akan menyebabkan akumulasi berlebih dari *oxygen reactive species* (ROS) dalam berbagai jaringan yang dipengaruhi oleh diabetes melitus (Mathebula, 2015). Obat-obatan jenis *aldose reductase inhibitor* yang beredar di pasaran bekerja dengan mencegah terjadinya *polyol pathway* yang dapat memperlambat atau memperbaiki terjadinya neuropati. Contohnya adalah Alrestatin, imirestat, dan sorbinil (Chalk *et al.*, 2010).

Salah satu tanaman obat yang diketahui mampu menghambat enzim *aldose reductase* adalah Tapak Dara (*Catharanthus roseus*). Tapak Dara merupakan tanaman endemik dan berasal dari Madagaskar. Tapak Dara memiliki tinggi $\pm$ 1 meter dan bentuk daunnya oval dengan panjang $\pm$ 2,5 cm-9 cm dan lebar $\pm$ 1 cm-1,8 cm. Bunga Tapak Dara termasuk jenis bunga tunggal, terletak

di ketiak daun, memiliki mahkota berbentuk terompet, panjang tangkai 2,5-3 cm, memiliki kelopak bertajuk lima, berbentuk runcing, benang sari berjumlah lima, kepala sari berwarna kuning, dan tangkai putik putih (Mishra dan Verma, 2017).

Daerah budidaya Tapak Dara adalah di area subtropis dan tropis seperti Australia, India, Malaysia, dan Pakistan dengan mayoritas budidayanya ditujukan sebagai tanaman hias. Efek farmakologi tanaman ini adalah sebagai pengobatan diabetes, malaria, demam berdarah, disentri, gigitan serangga, infeksi kulit, diare, leukemia, iritasi mata, dispepsia, disentri, sakit gigi, dan sakit tenggorokan jika direbus serta sebagai tonik dan memiliki sifat hipotensif, sedatif, penenang pada akarnya (LIPI, 2021).

Penelitian menunjukkan bahwa isolasi Tapak Dara menghasilkan *Tabersonine* yang merupakan alkaloid indol terpen yang memiliki efek anti kanker dan pelindung saraf yang kuat. Isolasi Tapak Dara juga menghasilkan *Chorismic Acid*, yaitu asam amino yang mampu menjadi pefenat yang digunakan sebagai strategi terapi spesifik yang potensial pada pasien kanker. Di samping itu, Tapak Dara yang diuji secara in vivo pada tikus dan kelinci diabetes menunjukkan kandungan *Catharanthine*, *Vindoline*, *Serpentine*, dan *Vindolinine*. Empat senyawa tersebut merupakan alkaloid yang dapat menurunkan kadar gula darah (Ulpa *et al.*, 2022).

Adapun tujuan studi ini adalah untuk menemukan kandungan bioaktif yang terdapat dalam Bunga Tapak Dara (*Catharanthus roseus*) yang potensial sebagai antidiabetes. Metode pendekatan yang dilakukan pada studi ini antara lain: skrining dengan *Lipinski Rule of Five* (RO5), skrining farmakofor, prediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADME-Tox), serta proses *molecular docking* terhadap reseptor *aldose reductase* terhadap 10 senyawa

dalam tanaman Tapak Dara, yaitu *Ajmalicine*, *Catharanthine*, *Chlorambucil*, *Chorismic Acid*, *Lochnericine*, *Perivine*, *Serpentine*, *Tabersonine*, *Ursolic Acid*, dan *Vindoline*. Studi *in silico* ini lebih dipilih untuk memberikan hipotesis mengenai aktivitas suatu senyawa atau ligan dikarenakan proses dari metode lain, seperti *in vitro* dan *in vivo* sulit menjelaskan secara sederhana bagaimana terjadinya mekanisme ligan dan target. Secara *in silico*, keempat metode analisis tersebut merupakan metode sinergi yang sangat baik dilakukan untuk *skrining* kandidat obat antidiabetes.

METODE

Dilakukan *skrining* menggunakan *Lipinski Rule of Five* (RO5), *skrining* farmakofor, prediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADME-Tox), serta proses molecular docking terhadap reseptor *aldose reductase* (2HV5) terhadap 10 senyawa dalam tanaman bunga tapak dara, yaitu *Ajmalicine*, *Vindoline*, *Perivine*, *Chorismic Acid*, *Ursolic Acid*, *Chlorambucil*, *Serpentine*, *Lochnericine*, *Tabersonine*, dan *Catharanthine* menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio*, *Chem3D*, *ChemDraw*, *Autodock*, *Autogrid*, dan *LigandScout* (NCBI, 2023). *Natural ligand* yang digunakan adalah Zopolrestat. Penelitian juga dibantu oleh database Protein Data Bank (PDB), *Dud.e*, dan PubChem.

Skrining dengan Lipinski Rule of Five (RO5)

Dilakukan pencarian senyawa aktif yang terkandung dalam Bunga Tapak Dara. Dari hasil pencarian didapatkan *Ajmalicine*, *Vindoline*, *Perivine*, *Chorismic Acid*, *Ursolic Acid*, *Chlorambucil*, *Serpentine*, *Lochnericine*, *Tabersonine*, dan *Catharanthine*. Lalu *skrining* RO5 dilakukan dengan melakukan pemodelan

molekul senyawa uji dua dimensi (2D) menggunakan *software ChemDraw* dan disimpan dalam bentuk .mol. Struktur senyawa uji dua dimensi diubah menjadi senyawa tiga dimensi (3D) menggunakan *Chem3D* dan disimpan dengan bentuk .mol. Dilakukan prediksi sifat fisikokimia dengan aplikasi *Chem3D* dan hasilnya dianalisis untuk mengetahui senyawa uji apa saja yang masuk ke dalam RO5.

Prediksi ADME-Tox

Struktur senyawa metabolit dicari melalui database PubChem, kemudian struktur senyawa digambarkan pada website <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/> dalam menu ADME (untuk prediksi ADME) dan menu *Toxicity* (untuk prediksi toksisitas). Hasil penggambaran struktur kemudian disubmit untuk mendapatkan hasil prediksi ADME/toksisitas.

Skrining Farmakofor

Dilakukan preparasi database yaitu *database active*, *decoy*, dan senyawa uji. Untuk *database active* dan *decoy* diunduh terlebih dahulu pada website <https://dude.docking.org>. File yang telah diunduh dibuka menggunakan aplikasi *LigandScout* pada bagian *Ligand Based Perspective*. Semua tipe *active* dan *decoy* diubah menjadi *training* dan *file* disimpan dengan format .ldb. Untuk senyawa uji pada bagian *Ligand Based Perspective* semua senyawa uji dimasukkan satu persatu. Semua tipe senyawa diubah menjadi *test* dan *file* disimpan dengan format .ldb.

Pada pemodelan farmakofor *file database active* dibuka dan ditekan cluster untuk membuat *cluster* pada semua senyawa. Senyawa diurutkan dari kolom *cluster id* dan tipenya diubah dari *training* menjadi *ignored* (disisakan 1). Didapatkan 1 tipe *training* pada setiap *cluster* dan ditekan *Create Pharmacophore*. *File* disimpan

dalam bentuk .pmz.

Untuk validasi farmakofor, *file* .pmz tadi dipindahkan ke *Screening Perspective*. Pada *Screening Perspective* dimasukkan *database active* dan *decoy*. Untuk *database active* diberi warna hijau sedangkan *decoy* diberi warna merah. *Screening* dilakukan dengan menekan *Perform Screening > Plot ROC Curve*.

Skrining farmakofor dilakukan dengan memasukan *database* senyawa uji pada *Screening Perspective*. Untuk *database* senyawa uji diberi warna hijau sedangkan *database* lainnya (*active* dan *decoy*) diberi warna merah. *Screening* dilakukan dengan menekan *Perform Screening*.

Molecular Docking

Working folder dibuat pada komputer, kemudian *file* autogrid4.exe dan autodock4.exe disalin ke dalam *working folder*. *Protein aldose reductase* kemudian diunduh dari *database Protein Data Bank (PDB)* pada laman *www.rcsb.org*, kemudian disimpan di dalam *working folder* dalam format .pdb.

Struktur protein kemudian dibuka dalam *Biovia Discovery Studio*, dibuat dalam tampilan *Publication Quality* dengan membuka tab *Scripts > Visualization > Publication Quality*, kemudian molekul air dihapus dari struktur menggunakan tab *Scripts > Selection > Water molecules*, dilanjutkan dengan membuka tab *Edit > Delete*. Lalu, menggunakan tab *Scripts > Selection > Ligand*, dilanjutkan dengan membuka tab *Edit > Delete* untuk memisahkan reseptor dari ligan alaminya.

Reseptor yang telah terpisah dari ligan kemudian disimpan dengan menu *save as* menggunakan nama *file receptor.pdb*. Kemudian pilih Tab *Edit > Undo* lalu pilih Tab *Script > Selection > Select Protein Chains* kemudian klik Tab *Edit > Delete* lalu simpan ligan yang telah

terpisah dari reseptor dengan memilih Tab *File > Save as* dan simpan dengan nama “Ligan_Alamia.pdb” dan tipe *file* .pdb.

Preparasi ligan dilakukan pertama-tama dengan membuka aplikasi *ChemDraw* dan menggambar struktur yang hendak diuji, kemudian simpan struktur yang telah digambar dengan format nama senyawa dan tipe *file* .cdxml. *File* ini kemudian dibuka menggunakan aplikasi *Chem3D*. Pada aplikasi *Chem3D*, pilih tab *Calculation > MM2 > Minimize Energy > Run*. *File* ini kemudian disimpan dengan memilih tab *File > Save as* dan simpan dengan nama Ligan_Uji_nama_senyawa dan tipe *file* .pdb.

File tersebut kemudian dibuka dalam aplikasi *Autodock Tools 1.5.7* dengan membuka tab *File > Read molecule > pilih Ligan_Uji_nama_senyawa.pdb*. Kemudian, pilih tab *Edit > Charges > Compute Gasteiger*. Lalu, pilih tab *Edit > Hydrogen > Add > All hydrogen > OK*. Klik tab *Edit > Hydrogen > Merge Non-Polar > Continue*. Pilih tab *ligand > Input > Pilih ligan*. Pilih kembali tab *ligand > Torsion Tree > Detect Root*.

Kemudian klik Tab *ligand > Torsion Tree > Choose Root*. Pilih tab *Ligand > Torsion Tree > Choose Torsion > Done*. Buka tab *Ligand > Torsion tree > Set Number of Torsion > pilih Fewest Atoms > Dismiss*. Kemudian, untuk menyimpan hasil preparasi, pilih tab *ligand > Output > Save as* dengan nama Ligan_Uji_Nama_Senyawa dengan tipe *file* .pdbqt dan simpan di *Working_Folder*. Lalu, untuk membersihkan laman *AutoDock* untuk kemudian melakukan preparasi reseptor, pilih tab *Edit > Delete > Delete All Molecule*.

Preparasi reseptor dilakukan dengan membuka *file receptor.pdb* dalam aplikasi *AutoDock Tools 1.5.7* dengan membuka tab *File > Read molecule > pilih receptor.pdb*. Kemudian, pilih tab *Edit > Charges > Add Kollman Charges*.

Lalu, pilih tab *Edit > Hydrogen > Add > Polar Only > OK*. Klik tab *Grid > Macromolecule > Choose > Pilih receptor > Simpan dengan nama receptor.pdbqt* dalam *working folder*. Lalu, pilih tab *Edit > Delete > Delete All Molecule*.

Parameter *Grid* ditetapkan dengan pertama-tama membuka *file receptor.pdbqt* dan Ligan_Uji_nama_senyawa.pdbqt menggunakan aplikasi *AutoDock Tools 1.5.7*. Kemudian, klik tab *Grid > Macromolecule > Choose > pilih Receptor*. Lalu, pilih tab *Grid > Set Map Types > Choose Ligand > pilih ligan*. Kemudian, klik tab *Grid > Grid box > Center Tab > center on ligand* untuk mengatur *grid box* tepat di mana ligan alami menempel pada reseptor. Untuk menyimpan *grid box* yang telah diatur, pilih tab *File > Close Saving Current*. Kemudian simpan dalam bentuk *file .gpf* dengan memilih tab *Grid > Output > Save GPF* dengan nama *file dock.gpf*.

Simulasi *docking* dilakukan dengan mula-mula membuka tab *Docking > Macromolecule > Set Rigid Filename > Open receptor.pdbqt*. Kemudian, pilih tab *Docking > Ligand > Choose > Pilih Ligan > Accept*. Klik tab *Docking > Search parameter > Genetic Algorithm > Atur menjadi 100 runs*. Kemudian, buka tab *Docking > Docking Parameter > Accept*.

Untuk menyimpan *docking parameters* yang telah diatur, pilih tab *Docking > Output > Lamarckian GA (4.2) > Save as dock.dpf*. Kemudian, untuk memulai simulasi *docking*, buka program *Command Prompt (CMD)* pada komputer, kemudian *directory* dipindahkan ke *working folder*. Setelah itu, untuk mengatur posisi *grid box*, ketik *autogrid4 -p dock.gpf -l dock.glg*. Kemudian, untuk melakukan simulasi *docking*, ketik *autodock4 -p dock.dpf -l dock.dlg*

terhadap senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan Tapak Dara dilakukan untuk memperkirakan kelarutan dan permeabilitas senyawa aktif. Senyawa aktif diprediksi cenderung memiliki permeasi dan absorpsi yang baik ketika: (1) berat molekul ≤ 500 Da, (2) nilai Log P ≤ 5 , serta (3) terdapat ≤ 5 donor ikatan hidrogen dan (4) ≤ 10 akseptor ikatan hidrogen (Benet *et al.*, 2016). Senyawa aktif yang melanggar lebih dari satu kriteria *Lipinski Rule of Five* diperkirakan dapat memiliki masalah bioavailabilitas. Hal ini dikarenakan obat yang memiliki berat molekul lebih dari 500 Da diprediksi memiliki kelarutan rendah dan mengalami kesulitan dalam melewati membran sel. Selanjutnya, senyawa aktif dengan nilai Log P > 5 cenderung kurang larut dalam larutan berair, sehingga tidak mampu mencapai permukaan membran. Sementara itu, senyawa yang terlalu hidrofilik juga tidak akan mampu melewati membran sel untuk sampai ke tempatnya bekerja. Selain itu, senyawa yang memiliki > 5 donor ikatan hidrogen dan/atau > 10 akseptor ikatan hidrogen cenderung terlalu polar untuk melewati membran sel (Sahu *et al.*, 2022).

Hasil *skrining* dengan *Lipinski Rule of Five* terhadap senyawa aktif dalam Tapak Dara dan kontrol positif dapat dilihat pada Tabel 1. Sebanyak 9 dari 10 senyawa aktif dalam Tapak Dara (*Vindoline*, *Ajmalicine*, *Perivine*, *Chlorambucil*, *Chorismic Acid*, *Catharanthine*, *Tabersonine*, *Serpentine*, dan *Lochnericine*) serta kontrol positif (*Zopolrestat*) yang diuji memenuhi keempat kriteria *Lipinski Rule of Five*. Sementara itu, senyawa *Ursolic Acid* melanggar kriteria nilai Log P, namun masih dikategorikan memenuhi *Lipinski Rule of Five* mengingat jumlah kriteria yang dilanggar tidak lebih dari satu (Ivanović *et al.*, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining dengan *Lipinski Rule of Five*

Tabel 1. Hasil Prediksi *Lipinski Rule of Five* Terhadap 10 Senyawa Uji dan Kontrol Positif

Nama senyawa	Berat Molekul (Da)	Log P	Donor Ikatan Hidrogen	Akseptor Ikatan Hidrogen
<i>Vindoline</i>	456.5	1.3	1	8
<i>Ursolic Acid</i>	456.7	7.3	2	3
<i>Ajmalicine</i>	352.4	2.7	1	4
<i>Perivine</i>	338.4	1.9	2	4
<i>Chlorambucil</i>	304.2	1.7	1	3
<i>Chorismic Acid</i>	226.2	0.2	3	6
<i>Catharanthine</i>	336.4	2.8	1	3
<i>Tabersonine</i>	336.4	3.4	1	4
<i>Serpentine</i>	348.4	2.6	0	4
<i>Lochnericine</i>	352.4	2.5	1	5
Zopolrestat (Kontrol positif)	419.4	3.5	1	9

Berdasarkan hasil prediksi ADME-Tox, didapatkan beberapa data diantaranya, Absorpsi, Distribusi, dan Toksisitas. Hasil Prediksi ADMET terhadap 10 senyawa uji dan kontrol positif dapat dilihat pada Tabel 2. Pada absorpsi, parameter yang dilihat adalah *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan Sel Caco-2. HIA dikatakan bagus apabila nilainya lebih dari 70%. Bagus disini memiliki arti mudah diabsorpsi. Sedangkan, sel Caco-2 memiliki permeabilitas yang baik jika nilainya lebih dari 4. Lalu, pada distribusi parameternya ada 2, yaitu *Plasma Protein Binding* (PPB) dan *Blood Brain Barrier* (BBB). Jika senyawa uji memiliki ikatan kimia yang kuat, maka nilai nya lebih dari 90%. Sedangkan, jika senyawa uji

memiliki ikatan kimia yang lemah, maka nilainya kurang dari 90%. Pada BBB, apabila nilainya lebih dari 2 maka semakin mudah diabsorpsi ke sistem saraf pusat. Dalam menembus sawar darah otak, kemampuan suatu obat perlu diperhatikan dalam mengurangi terjadinya efek samping dan adanya toksisitas. Kemudian, pada toksisitas parameternya juga ada 2, yaitu mutagen dan karsinogen. Mutagen memperlihatkan apakah obat yang kita uji ini ketika dikonsumsi menyebabkan mutasi di sel atau tidak. Selain itu, karsinogen juga memperlihatkan apakah obat yang kita uji bersifat karsinogenik atau tidak (Chander *et al.*, 2017; Krihariyani *et al.*, 2020; Listyani *et al.*, 2022).

Tabel 2. Hasil Prediksi ADMET Terhadap 10 Senyawa Uji dan Kontrol Positif

Nama senyawa	HIA (%)	Caco2 (nm/sec)	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
<i>Vindoline</i>	97.361	28.529	47.978	0.069	Non- Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (-)
<i>Ursolic Acid</i>	95.996	21.862	100.000	8.008	Non- Mutagen	Tikus: (+) Mencit: (+)
<i>Ajmalicine</i>	93.310	39.469	55.507	1.990	Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (-)
<i>Perivine</i>	90.587	18.272	55.764	1.197	Non- Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (-)
<i>Chlorambucil</i>	97.639	23.016	92.296	0.178	Mutagen	Tikus: (+) Mencit: (-)

Nama senyawa	HIA (%)	Caco2 (nm/sec)	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
<i>Chorismic Acid</i>	60.192	21.107	58.745	0.235	Mutagen	Tikus: (+) Mencit: (+)
<i>Catharanthine</i>	93.341	42.035	81.532	6.495	Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (+)
<i>Tabersonine</i>	95.898	28.744	72.3619	1.293	Mutagen	Tikus: (+) Mencit: (-)
<i>Serpentine</i>	97.506	43.484	54.834	0.522	Mutagen	Tikus: (+) Mencit: (+)
<i>Lochnericine</i>	95.605	28.721	62.884	0.646	Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (-)
Zopolrestat (Kontrol positif)	99.210	21.700	100.000	0.400	Mutagen	Tikus: (-) Mencit: (-)

Database active dan *database decoy* untuk reseptor *aldose reductase* (kode PDB: 2hv5) yang diunduh dari website <https://dude.docking.org> diseleksi, sehingga diperoleh 100 senyawa untuk *database active* dan 400 senyawa untuk *database decoy*. Pembuatan model farmakofor pada aplikasi *LigandScout* menggunakan *database* yang dipreparasi sebelumnya menghasilkan 10 model farmakofor. Kemudian, masing-masing dari 10 model farmakofor tersebut divalidasi dengan cara memplotkan kurva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) untuk melihat kemampuan model farmakofor tersebut untuk membedakan senyawa aktif (*active*) dengan yang inaktif (*decoy*). Pada kurva ROC, sumbu x menunjukkan jumlah % *decoys* yang diperoleh (*false positive rate*) atau ditulis sebagai *1-Specificity*. Semakin kecil nilai

pada sumbu x, maka semakin akurat. Sebaliknya, sumbu y pada kurva ROC merupakan jumlah % *actives* yang diperoleh (*true positive rate*) atau ditulis sebagai *Sensitivity*. Semakin besar nilai pada sumbu y, maka semakin baik akurasi. Sementara itu, nilai AUC (*area under curve*) juga mengindikasikan akurasi, sehingga semakin besar nilainya maka semakin baik kemampuannya untuk menyaring senyawa *active* dari senyawa *decoy*. Rentang nilai AUC pada ROC adalah $0 \leq AUC \leq 1$. Ketika nilai AUC = 0.5, penyeleksian tidak bekerja sama sekali. Saat nilai AUC > 0.5 dan semakin dekat ke nilai 1, maka semakin tinggi akurasi (Luo *et al.*, 2021). Nilai AUC ≥ 0.7 dapat dianggap *valid*, yaitu suatu metode memiliki diskriminasi yang dapat diterima (Sangande *et al.*, 2020).

Tabel 3. Hasil Validasi Skrining Farmakofor Menggunakan Kurva ROC (*Receiver Operating Characteristic*)

Model Farmakofor	Hits	True Positive	False Positive	AUC 100% (<i>area under curve</i>)
1	220	66	154	0.64
2	217	67	150	0.69
3	436	99	337	0.74
4	435	99	336	0.72
5	435	99	336	0.72
6	435	99	336	0.72
7	437	99	338	0.72
8	429	95	334	0.68

Model Farmakofor	Hits	True Positive	False Positive	AUC 100% (area under curve)
9	428	95	333	0.69
10	424	98	326	0.77

Selanjutnya yang kami lakukan adalah simulasi penambatan molekuler (*docking*). Berdasarkan hasil validasi *skrining* farmakofor menggunakan kurva ROC, diperoleh 10 model. Seluruh hasil ini dapat dilihat pada tabel 3. Dari 10 model yang didapatkan, terlihat bahwa model 10 memiliki akurasi yang paling baik dengan nilai AUC 100% = 0.77. Maka, digunakan model farmakofor 10 untuk melakukan *skrining* terhadap 10 senyawa uji dan kontrol positif. Diperoleh 4 dari 10 senyawa uji yang hit terhadap model farmakofor 10, yaitu senyawa *Lochnericine*, *Chorismic Acid*, *Vindoline*, dan *Perivine*. Di antaranya, terdapat 2 senyawa, yaitu *Lochnericine* dan *Chorismic Acid* yang memiliki *Pharmacophore Fit Score* lebih besar dari kontrol positif yang digunakan (Zopolrestat). Hasil *skrining* farmakofor ini dapat dilihat pada tabel 4.

Berdasarkan hasil simulasi penambatan molekuler, didapatkan beberapa data. *Gridbox* berupa X=40; Y=40; Z=40, kemudian *Grid Coordinate* di X=17.247; Y=-6.715; Z=13.582, dan *Docking Parameters* berupa *GA Runs*=100, Jarak=0.375Å.

Selain itu, kami juga melakukan Validasi Metode (*redocking*). Validasi metode ini dilakukan melalui *redocking* (*docking* ulang) ligan alami yang sebelumnya telah dipisahkan

terhadap reseptor. Untuk mengetahui apakah hasil yang didapat dapat dinyatakan *valid*, dapat dilihat dari nilai *reference* RMSD-nya. Seluruh nilai RMSD dapat dilihat pada tabel 5. RMSD ini menunjukkan kemiripan antara dua koordinat, yaitu ligan alami yang sudah melalui *redocking* dengan ligan alami sebelum di *redocking*. Nilai RMSD yang baik jika RMSD kurang dari 2Å karena semakin kecil nilai RMSD maka semakin mirip konformasinya.

Hasil *docking* dari senyawa - senyawa tersebut menunjukkan pula *binding energy*. konstanta inhibisi, dan interaksi molekul obat dengan residu asam amino (Tabel 6). *Binding energy* menunjukkan jumlah dari seluruh gaya intramolekuler yang bekerja pada kompleks ligan-reseptor (Matossian *et al.*, 2014). Konstanta inhibisi merupakan indikator potensi suatu senyawa *inhibitor*, dan menyatakan konsentrasi yang dibutuhkan bagi senyawa untuk menyebabkan terjadinya setengah dari inhibisi maksimum (Adeboye *et al.*, 2022).

Sementara itu, interaksi molekul obat dengan asam amino menggambarkan residu-residu asam amino yang berperan penting dalam interaksi antara makromolekul dengan ligan (Ulayya *et al.*, 2021). Oleh karena itu, untuk mengetahui apakah suatu molekul memiliki

Tabel 4. Hasil Prediksi *Lipinski Rule of Five* Terhadap 10 Senyawa Uji dan Kontrol Positif

Nama Senyawa	<i>Pharmacophore Fit Score</i>
<i>Lochnericine</i>	42.30
<i>Chorismic Acid</i>	36.62
Zopolrestat (Kontrol positif)	36.02
<i>Vindoline</i>	35.78
<i>Perivine</i>	35.38

Tabel 5. Hasil Validasi Metode (*redocking*)

<i>Rank</i>	<i>Sub- rank</i>	<i>Run</i>	<i>Binding Energy</i> (kcal/mol)	<i>Cluster RMSD</i>	<i>Referen- ce RMSD</i>
1	1	19	-6.46	0.00	0.58
1	2	64	-6.46	0.07	0.61
1	3	78	-6.46	0.03	0.59
1	4	98	-6.45	0.03	0.58
1	5	25	-6.45	0.10	0.55
1	6	88	-6.45	0.05	0.55
1	7	87	-6.45	0.11	0.56
1	8	72	-6.44	0.06	0.56
1	9	41	-6.44	0.16	0.53
1	10	56	-6.44	0.19	0.55

aktivitas inhibisi yang sama dibandingkan dengan ligan alami, maka residu asam amino yang berinteraksi dengan masing - masing senyawa dibandingkan dengan residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan alami.

Pada ligan alami, dapat diamati bahwa ligan alami berinteraksi dengan reseptor via : ikatan *salt bridge* dengan *attractive charge* pada asam amino His110 dan Lys77; ikatan hidrogen konvensional pada asam amino Trp111 dan Thr113; ikatan hidrogen karbon pada asam amino Pro310; ikatan Pi-Sulfur pada Trp79, Cys298, Phe122, dan Cys80; ikatan *Pi-Pi Stacked* pada asam amino Trp20; dan ikatan *alkyl* dan *Pi-alkyl* pada asam amino Val47, Leu300, dan Cys303.

Pengamatan terhadap residu asam amino yang berinteraksi dengan masing - masing senyawa uji dibandingkan dengan residu yang

berinteraksi dengan ligan alami menunjukkan bahwa interaksi senyawa uji *Chlorambucil* dengan reseptor merupakan yang paling mirip dengan ligan alami dibandingkan dengan senyawa uji lainnya, dengan adanya kesamaan ikatan seperti ikatan *salt bridge* dengan *attractive charge* pada asam amino His110 dan Lys77; ikatan hidrogen pada asam amino Trp111 dan Pro310; ikatan Pi-Sulfur pada Trp79, Phe122, dan Cys80; ikatan *Pi-Pi Stacked* pada asam amino Trp20; dan ikatan *alkyl* dan *Pi-alkyl* pada asam amino Val47, dan Leu300. Selain itu, terdapat pula ikatan seperti ikatan hidrogen pada residu asam amino Cys298 dan Cys303. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa *Chlorambucil* merupakan senyawa yang diduga akan memiliki aktivitas terhadap reseptor yang paling mirip dengan *natural ligand*.

Tabel 6. Hasil Luaran Simulasi Penambatan Molekuler Terhadap 10 Senyawa Uji dan Kontrol Positif

<i>Nama senyawa</i>	<i>Cluster</i>	<i>Binding energy</i> (kcal/mol)	<i>KI</i> (konstanta inhibisi)	<i>Ikatan Hidrogen</i>	<i>Ikatan van der waals</i>	<i>Lain-Lain</i>
<i>Vindoline</i>	60	-7.34	2.74 μ M	His110; Ala299; Val47	-	<i>Alkyl</i> dan <i>Pi-Alkyl</i> = Pro218; Leu300; Phe122; Tyr209; Trp20;Trp219; Cys298; Trp111; Trp79

Nama senyawa	Cluster	Binding energy (kcal/mol)	KI (konstanta inhibisi)	Ikatan Hidrogen	Ikatan van der waals	Lain-Lain
<i>Ursolic Acid</i>	60	-2.76	3720 μ M	-	-	Pi-Sigma = Trp20 Pi-Alkyl dan Alkyl= Tyr48; Leu300; Trp219; Cys298; Val47; Pro218; Phe122
<i>Ajmalicine</i>	15	-8.90	298.31 nM	-	-	<i>Pi-Alkyl</i> dan <i>Alkyl</i> = Phe122; Val47; Leu300; Trp20; Trp111; Trp219
<i>Perivine</i>	100	-8.58	0.44693 μ M	Trp111; Cys298	-	<i>Pi-Alkyl</i> = Phe122 <i>Pi-Pi Stacked</i> = Trp20 <i>Pi-Pi T-Shaped</i> = Tyr209 <i>Pi-Cation</i> = His110
<i>Chlorambucil</i>	99	-6.15	18.37 μ M	Cys298; Trp111; Cys303; Pro310	-	<i>Salt bridge & Attractive charge</i> = His110; Lys77 <i>Pi-Sulfur</i> = Phe122; Trp79; Cys80 <i>Pi-Pi Stacked</i> = Trp20 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi- Alkyl</i> = Leu300; Val47; Tyr309
<i>Chorismic Acid</i>	28	-4.53	131.61 μ M	His110	-	<i>Pi-Pi T-Shaped</i> = Phe122; Trp20 <i>Pi-Alkyl</i> = Val47
<i>Catharanthine</i>	46	-8.58	269.53 nM	Ala299	-	Pi-Sigma = Trp219 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi- Alkyl</i> = His110; Trp79; Cys303; Cys298; Trp111; Phe122; Leu300
<i>Tabersonine</i>	93	-8.86	290.66 nM	Trp111; Tyr48	-	<i>Pi-Sulfur</i> = Cys303 <i>Pi-Pi T-shaped</i> = Phe122 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi- Alkyl</i> = His110; Trp20; Leu300; Trp219
<i>Serpentine</i>	100	-10.07	41.41 nM	Cys303	-	Pi-Sigma = Trp20 <i>Pi-Sulfur</i> = Cys80 <i>Pi-Pi Stacked</i> = Trp111; Phe115 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi-Alkyl</i> = Val47; Tyr48; Leu300; Phe122; Trp219

Nama senyawa	Cluster	Binding energy (kkal/mol)	KI (konstanta inhibisi)	Ikatan Hidrogen	Ikatan van der waals	Lain-Lain
<i>Lochnericine</i>	54	-8.28	1.09 μ M	Trp20; Val47	-	<i>Pi-Pi Stacked</i> = Trp111 <i>Pi-Pi T-Shaped</i> = Trp111 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi-Alkyl</i> = Leu300; Pro218; Phe122; Cys298; Trp219
Zopolrestat (Kontrol positif)	62	-10.98	8.97 nM	Tyr48; Trp111; Thr113; Cys303; Pro310	-	<i>Pi-Sulfur</i> = Phe122; Cys80; Trp79 <i>Pi-Pi Stacked</i> = Trp20 <i>Alkyl</i> dan <i>Pi-Alkyl</i> = Tyr309; Val47; Leu300

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian metode *molecular docking* yang telah dilakukan, ditemukan bahwa berdasarkan *binding energy*, secara berturut - turut dari paling rendah ke paling tinggi, senyawa *serpentine*, *ajmalicine*, dan *tabersonine* memiliki *binding energy* yang paling rendah dibandingkan dengan senyawa-senyawa lainnya. Sementara itu, konstanta inhibisi *serpentine*, *catharanthine*, dan *tabersonine* secara berturut - turut merupakan yang terkecil dibandingkan dengan senyawa lainnya. Namun, pengamatan terhadap ikatan asam amino antara masing - masing senyawa dengan reseptor menunjukkan bahwa ikatan antara senyawa *chlorambucil* dan reseptor adalah yang paling mendekati senyawa kontrol positif (Zopolrestat) dibandingkan dengan senyawa lainnya. Pada proses *pharmacophore screening* ditemukan bahwa senyawa *Lochnericine* dan *Chorismic acid* memiliki nilai *pharmacophore fit* yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeboye, O.O., Oyeleke, F. O., Agboluaje, S. A. (2022). Molecular Docking of Inhibitory Activities of *Syzygium Cordatum* against *Mycobacterium Tuberculosis*. *Advanced Journal of Chemistry*. Vol. 5(2): 147-163.
- Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., dan Oprea, T. I. (2016). BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced drug delivery reviews*. 101: 89-98.
- Chander, S., Tang, C. R., Al-Maqtari, H. M., Jamalis, J., Penta, A., Hadda, T. B., Sirat, H. M., Zheng, Y. T., dan Sankaranarayanan, M. (2017). Synthesis and Study of Anti-HIV-1 RT Activity of 5-benzoyl-4-methyl-1,3,4,5-tetrahydro-2H-1,5-benzodiazepin-2-one Derivatives. *Bioorganic Chemistry*. 72: 74-79.
- Chalk, C., Benstead, T. J., dan Moore, F. (2010). Aldose Reductase Inhibitors for the Treatment of Diabetic Polyneuropathy (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 4: 1-45.
- International Diabetes Federation. (2022). *IDF Atlas Reports*. International Diabetes Federation. Brussels.
- Ivanović, V., Rančić, M., Arsić, B., dan Pavlović, A. (2020). Lipinski's rule of five, famous extensions and famous exceptions. *Chemia*

- Naissensis*. 3(1): 171–177.
- Krihariyani, D., Sasongkowati, R., dan Hayanto, E. (2020). Studi In Silico Sifat Farmakokinetik, Toksisitas, dan Aktivitas Imunomodulator Brazilein Kayu Secang Terhadap Enzim 3-Chymotrypsin-Like Cysteine Protease Coronavirus. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*. 1(1): 76-90.
- Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (2021). *Katalog Tumbuhan Koleksi Kebun Raya Gianyar Bali*. Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya. Bali.
- Listyani, T. A., Fauzi, F., dan Wardani, T. S. (2022). In Silico Adme and Toxicity Studies of Derivative Phthalimide Compounds as Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor. *Global Health Science Group*. 3(1): 17-26.
- Luo, L., Zhong, A., Wang, Q., dan Zheng, T. (2021). Structure-Based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, Molecular Docking, ADMET, and Molecular Dynamics (MD) Simulation of Potential Inhibitors of PD-L1 from the Library of Marine Natural Products. *Marine Drugs*. 20(29): 1-18.
- Mathebula, S. D. (2015). Polyol Pathway: A Possible Mechanism of Diabetes Complications in the Eye. *Vision Eye Health*. 74(1): 1-5.
- Matossian, M., Vangelderren, C., Papagerakis, P., Zheng, L., Wolf, G. T., dan Papagerakis, S. (2014). In silico modeling of the molecular interactions of antacid medication with the endothelium: novel therapeutic implications in head and neck carcinomas. *International journal of immunopathology and pharmacology*. Vol. 27(4): 573–583.
- Mishra, J. N. dan Verma, N. K. (2017). A Brief Study on Catharanthus Roseus: A Review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2(2): 20-23.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Ajmalicine*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ajmalicine>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Chlorambucil*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorambucil>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Chorismic Acid*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chorismic-acid>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Lochnericine*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lochnericine>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Perivine*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perivine>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Serpentine*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serpentine>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Tabersonine*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tabersonine>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Ursolic Acid*. Diakses dari https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ursolic_acid.
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Vindoline*. Diakses dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vindoline>.

- Sahu, V. K., Singh, R. K., dan Singh, P. P. (2022). Extended Rule of Five and Prediction of Biological Activity of Peptidic HIV-1-PR Inhibitors. *Trends Journal of Sciences Research*. 1(1): 20-42.
- Sangande, F., Julianti, E., dan Tjahjono, D. H. (2020). Ligand-Based Pharmacophore Modeling, Molecular Docking, and Molecular Dynamic Studies of Dual Tyrosine Kinase Inhibitor of EGFR and VEGFR2. *International journal of molecular sciences*. 21(20): 7779.
- Scripps Research. (2014). *AutoDock*. Diakses dari <https://ccsb.scripps.edu/autodock/>.
- Ulayya, H. F., Nursayyida, A., Atmaja, F. I., dan Santoso, B. (2021). Study of Virtual Molecular Docking of Avocados Compounds Against *Pseudomonas Aeruginosa* (5n5h) By Carbapenemase Using Dock 6 Algorithm. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*. Vol. 6(2): 183-191.
- Ulpa, M., Sitanggang, K., Walida, H., dan Sepriani, Y. (2022). Karakteristik Morfologi dan Analisis Kandungan Senyawa Fitokimia Berbagai Tapak Dara (*Catharanthus roseus*). *Jurnal Mahasiswa Agroteknologi (JMATEK)*. 3(2): 49-57.