

***In Silico* Study of Betel Leaves Compound (*Piper betle* L.) as Acetylcholinesterase (AChE) Enzyme Inhibitor in Alzheimer Disease**

Farhah Az-Zahra^{*}, Janifa Afidika, Sagung D.A. Diamantha, Almeira E. Rahmani, Syifa Fatimah, Diah L. Aulifa, Angela A. Elaine, Bernap D.P. Sitinjak

Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat

Submitted 03 July 2022; Revised 22 August 2022; Accepted 24 August 2022; Published 30 August 2022

*Corresponding author: farhah20001@mail.unpad.ac.id

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease caused by decreased synthesis of acetylcholine due to the breakdown of acetylcholine into choline and acetate by the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The compound with AChE inhibitor activity are known as promising drug candidate for this disease. In this study, an *in-silico* study of compounds in Betel Leaf (*Piper betle* L.) was carried out to find out whether these compounds can be used as drug candidates in the treatment of Alzheimer's using molecular docking methods and prediction of Lipinski's and PreADMET. The tests were carried out using software AutoDock Tools-1.5.6 for molecular docking simulation, with the SwissADME and PreADMET sites to determine the drug likeness and ADMET profile of the tested ligands. As the results, Piperine is known as the best drug candidate with binding energy values and inhibition constants of -9.97 kcal/mol and 0.049 μ m, respectively, with hydrogen bonds occurring at the amino acid residue of PHE 295.

Keywords: Alzheimer, Acetylcholinesterase inhibitor, Betel leaf (*Piper betle* L.), Molecular Docking

Studi *In Silico* Senyawa dalam Daun Sirih (*Piper betle* L.) sebagai Inhibitor Enzim Asetilkolinesterase (AChE) pada Penyakit Alzheimer

Abstrak

Alzheimer merupakan penyakit neurodegeneratif yang disebabkan oleh penurunan sintesis asetilkolin akibat pemecahan asetilkolin menjadi kolin dan asetat oleh enzim asetilkolinesterase (AChE). Senyawa dengan aktivitas inhibitor AChE diketahui merupakan kandidat obat yang menjanjikan untuk mengobati penyakit ini. Pada penelitian ini, dilakukan studi *in-silico* terhadap senyawa dalam Daun Sirih (*Piper betle* L.) untuk mengetahui apakah senyawa tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat obat dalam pengobatan Alzheimer menggunakan metode penambatan molekuler, prediksi Lipinski's dan PreADMET. Pengujian dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools-1.5.6. untuk simulasi penambatan molekuler serta situs SwissADME dan PreADMET untuk menentukan *drug likeness* serta profil ADMET ligan uji. Dari hasil analisis, diketahui senyawa Piperin merupakan kandidat obat yang paling baik dengan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi berturut-turut sebesar -9.97 kkal/mol dan 0.049 μ m, dengan ikatan hidrogen yang terjadi pada residu asam amino PHE 295

Kata Kunci: Alzheimer, Asetilkolinesterase inhibitor, Daun Sirih (*Piper betle* L.), Penambatan molekuler

1. Pendahuluan

Alzheimer merupakan penyakit neurodegeneratif yang berkaitan dengan usia yang menjadi penyebab utama penyakit ini. Penyakit Alzheimer merupakan jenis gangguan otak yaitu terjadinya kematian sel-sel otak yang menjadi penyebab disfungsi memori, pemikiran, analisa, bahasa, dan aktivitas nervus lainnya.¹ Penyakit Alzheimer ditandai dengan demensia yang umumnya dimulai dengan penurunan daya ingat. Penurunan daya ingat atau kemampuan mengenali sesuatu yang kemudian akan semakin parah akibat gangguan di dalam otak yang sifatnya meningkat sehingga akhirnya penderita mengalami ketidakmampuan mengingat atau mengenali sesuatu. Selain itu, gejala yang umum terjadi pada penderita Alzheimer diantaranya kebingungan, gangguan berbicara, agitasi, hingga halusinasi.²

Pada neuro patologi penyakit Alzheimer, terjadi kehilangan neuron dan atrofi di korteks temporofrontal yang menyebabkan inflamasi, penumpukan plak amiloid, dan pembentukan kelompok fragmen protein serta bundel serat kusut yang tak normal (*Intracellular neurofibrillary tangles*). Terdapat empat hipotesis umum yang mungkin menyebabkan keadaan ini yaitu hipotesis hiperfosforilasi protein tau, hipotesis stres oksidatif, hipotesis ion logam, dan hipotesis kolinergik. Pada hipotesis kolinergik, terjadi penurunan ikatan reseptor dengan neuron kolinergik pada area otak spesifik dan penurunan neurotransmisi yang dimediasi asetilkolin. Pada orang dewasa yang sehat, rendahnya ikatan reseptor menyebabkan kecepatan pemrosesan informasi yang lambat.³

Acetylcholinesterase (AChE) merupakan enzim yang mendegradasi neurotransmitter asetilkolin dan berperan penting untuk regulasi neurotransmisi pada sinapsis di semua area sistem saraf. Adanya gangguan pada neurotransmisi kolinergik ini berpengaruh secara signifikan pada perkembangan penyakit Alzheimer.⁴ Pengobatan menggunakan senyawa yang merupakan acetylcholinesterase inhibitor merupakan inti dari terapi Alzheimer.⁵ Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan lebih lanjut

terhadap obat anti Alzheimer yang dapat menghambat kerja enzim ini perlu dilakukan untuk meningkatkan efektivitas terapi anti Alzheimer. Obat-obatan yang dapat bekerja sebagai acetylcholinesterase inhibitor antara lain galantamine, rivastigmine, dan donepezil. Donepezil telah digunakan selama lebih dari 20 tahun sebagai dasar terapi simptomatik Alzheimer.³ Berdasarkan keterangan diatas, protein target yang dipilih adalah enzim AChE dengan kode PDB 4EY7. Enzim AChE (4EY7) ini diklasifikasikan sebagai enzim yang menghidrolisis karboksilat pada ikatan ester (EC 3.1.1.7).⁶

Daun sirih (*Piper betle* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang sudah banyak digunakan dalam penelitian yang berfungsi sebagai tanaman obat. Sirih sendiri merupakan tanaman yang termasuk dalam famili Piperaceae. Tanaman sirih biasanya tumbuh merambat dan menjalar dengan tinggi sekitar 5 hingga 15 m. Tanaman sirih memiliki bagian berupa akar, batang, biji, dan daun. Tetapi pada dunia pengobatan, bagian sirih yang biasa digunakan yaitu bagian daun.⁷ Tanaman sirih ini biasa tumbuh pada wilayah dengan iklim tropis, salah satunya Indonesia.⁸ Daun sirih hijau mengandung berbagai macam kandungan kimia, antara lain minyak atsiri, terpinen, seskuiterpen, fenilpropan, dan terpen. Terdapat pula katekin dan tanin yang termasuk senyawa polifenol. Selain itu terkandung juga alkaloid, flavonoid, fenol dan steroid.⁹ Daun sirih memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, antimikroba, antiseptik, dan lain-lain. Di beberapa penelitian sebelumnya, daun sirih ini juga diteliti untuk mengobati Alzheimer.¹⁰

Alkaloid merupakan salah satu kandidat paling menjanjikan dalam pengobatan Alzheimer karena strukturnya yang mengandung kompleks nitrogen. Salah satu tempat berikatan pada asetilkolinesterase melibatkan interaksi dengan nitrogen bermuatan positif.¹¹ Piperin, sebagai salah satu alkaloid, memiliki ikatan poliena yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan kuat dan nitrogen tersier yang dapat menghambat enzim asetilkolinesterase atau meningkatkan sistem kolinergik pada otak.¹² Oleh karena

itu, hipotesis awal pada penelitian ini adalah piperin pada daun sirih menjadi kandidat terkuat sebagai obat Alzheimer.

Penelitian ini bertujuan untuk meneliti potensi Daun Sirih (*Piper betle* L.) sebagai kandidat obat untuk penyakit Alzheimer. Senyawa pada daun sirih yang diuji pada penelitian ini diantaranya ascorbic acid, arecoline, eugenol, carvacrol, riboflavin, thiamin, quercetin, beta caryophyllene, phytol, beta sitosterol, hydroxychavicol, niacin, piperbetol, piperin, dan piperitol. Pemilihan senyawa tersebut dikarenakan senyawa-senyawa yang terkandung dalam Daun Sirih (*Piper betle* L.) tersebut diketahui memiliki aktivitas dalam menghambat degenerasi otak penyebab Alzheimer.¹² Sedangkan untuk senyawa pembanding yang digunakan yaitu donepezil karena senyawa tersebut sudah diketahui dapat digunakan secara umum dalam terapi Alzheimer. Diketahui pula bahwa donepezil merupakan satu-satunya obat yang dapat digunakan untuk terapi Alzheimer dalam spektrum luas, baik untuk Alzheimer dengan tingkat rendah sampai dengan berat.¹³

2. Metode

2.1. Alat

Perangkat keras yang digunakan adalah berupa laptop pribadi dengan spesifikasi processor AMD Ryzen 5 5500U CPU @2.10 GHz RAM 8.00 GB dengan sistem operasi Windows 10 64-bit. Adapun beberapa situs dan perangkat lunak yang digunakan selama proses studi *in-silico* ini antara lain :

1. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) yang digunakan untuk mengunduh struktur protein reseptor.
2. Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk mengunduh struktur senyawa uji dan senyawa pembanding.
3. Aplikasi ChemDraw Ultra 12.0 untuk menggambar struktur senyawa uji dan senyawa pembanding serta Chem3D Pro 12.0 untuk meminimalkan energi dari ligan uji

4. SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) untuk mengetahui prediksi Lipinski's Rule of Five dari senyawa uji dan senyawa pembanding.
5. PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) untuk mengetahui prediksi ADME dan Toksisitas senyawa uji dan senyawa pembanding
6. Aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020 untuk preparasi ligan dan reseptor serta untuk visualisasi hasil penambatan molekuler
7. Aplikasi AutoDock Tools-1.5.6 untuk melakukan analisis penambatan molekuler

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk molecular docking adalah protein target yang diperoleh dari PDB Database dalam format PDB dengan kode PDB ID 4EY7, ligan alami dan senyawa pembanding berupa Donepezil, serta senyawa uji Asam Askorbat, Arekolin, Eugenol, Carvacrol, Riboflavin, Thiamin, Quercetin, β -Caryophyllene, Phytol, β -Sitosterol, Hydroxychavicol, Niacin, Piperbetol, Piperine, dan Piperitol.

2.3. Prosedur

2.3.1. Prediksi Lipinski's Rule of Five

Prediksi *Lipinski's Rule of Five* dilakukan untuk mengetahui profil *drug-likeness* dari senyawa uji dan senyawa pembanding. Analisis ini dilakukan melalui situs SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) dengan menguji senyawa uji dan senyawa pembanding yang telah dibuat struktur 2D nya terlebih dahulu menggunakan ChemDraw. Parameter yang termasuk ke dalam *Lipinski's Rule of Five* antara lain bobot molekul, nilai log P, ikatan hidrogen donor dan ikatan hidrogen akseptor.

2.3.2. Penentuan ADMET

Penentuan ADMET (Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicology) dilakukan untuk mengetahui profil fisikokimia serta toksisitas dari senyawa uji dan senyawa pembanding. Analisis ini dilakukan melalui situs PreADMET (<http://www.preadmet>.

webservice.bmdrc.org/). Parameter yang dianalisis dalam tahap ini antara lain nilai %HIA (*Human Intestinal Absorption*), Caco-2 (*Cancer coli-2*), BBB (*Blood-Brain Barrier Penetration*), PPB (*Plasma Protein Binding*), serta hasil uji toksisitas dengan *Ames Test* dan dengan *Rodent Carcinogenicity*.

2.3.3. Preparasi Ligan dan Reseptor

Protein target AChE dengan PDB ID: 4EY7 diunduh terlebih dahulu melalui situs Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) kemudian dipreparasi dengan menghilangkan molekul airnya serta memisahkan antara struktur ligan alami dengan reseptornya menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020. Ligan uji dan ligan pembanding juga dipreparasi menggunakan aplikasi yang sama dengan meminimalkan energi pada ligan terlebih dahulu menggunakan Chem3D Pro 12.0. Selanjutnya, preparasi ligan dilanjutkan dengan aplikasi AutoDock untuk menambahkan atom hidrogen, menggabungkan senyawa menjadi non polar dan memberi muatan Gasteiger pada ligan lalu menginput torsi ke dalamnya. Sedangkan, untuk preparasi reseptor dilakukan dengan menambahkan atom hidrogen polar dan memberi muatan Kollman pada reseptor yang telah dipisahkan dari ligan alaminya menggunakan aplikasi Autodock.

2.3.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Dilakukan validasi terlebih dahulu untuk menentukan posisi dan ukuran *grid box* yang akan digunakan dalam simulasi penambatan molekuler. Validasi ini dilakukan dengan menambatkan kembali ligan alami pada reseptor menggunakan aplikasi AutoDock kemudian mengatur ukuran serta posisi *grid box* sedemikian sehingga ketika dilakukan *running* dengan nilai *genetic algorithm* sebesar 10, hasil validasi yang dapat diterima adalah apabila nilai *Reference RMSD* yang bernilai ≤ 2 Å serta energi ikatan yang bernilai negatif atau semakin kecil. Pada artikel ini, *grid box* yang digunakan bernilai sebagai berikut, *Grid Box* ($x = 40$; $y = 24$; $z = 34$), *Grid Coordinate* ($x = -13.988$; $y = -43.906$; z

$= 27.109$) dengan jarak 0.375 Å.

Selanjutnya, dilakukan tahap penambatan molekuler ligan uji terhadap reseptor atau protein target (AChE PDB ID: 4EY7) menggunakan tahapan yang sama seperti pada tahap validasi tetapi dengan menggunakan *Genetic Algorithm Lamarckian* yang bernilai 100. Dalam proses validasi, nilai *genetic algorithm* yang digunakan bernilai lebih kecil daripada saat proses *running* untuk penambatan molekuler ligan uji. Tujuannya, agar proses validasi dapat diperoleh dengan lebih cepat dengan hasil yang tidak jauh berbeda dengan hasil *running* menggunakan *genetic algorithm* yang lebih besar. Menurut literatur, besarnya nilai *genetic algorithm* dalam proses *running* seperti ini tidak menunjukkan kontribusi yang signifikan terkait dengan validitas dari hasil penambatan molekuler menggunakan AutoDock.¹⁴

Hasil penambatan molekuler selanjutnya dianalisis menggunakan AutoDock untuk mengetahui nilai energi ikatan serta KI (Konstanta Inhibisi) yang paling baik dari setiap ligan yang diuji. Hasil analisis tersebut kemudian divisualisasi menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020 untuk mendapatkan bentuk visualisasi 2D dan 3D dari ligan uji yang sudah ditambatkan pada reseptor.

3. Hasil

3.1. Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

Parameter yang digunakan dalam prediksi ini antara lain bobot molekul, nilai log P, ikatan hidrogen donor dan ikatan hidrogen akseptor. Dari pengujian secara daring ini didapatkan hasil seperti yang tertera pada **Tabel 1**. Diketahui bahwa seluruh senyawa uji dari Daun Sirih (*Piper betle* L.) yang dijadikan sebagai kandidat senyawa obat memenuhi syarat aturan Lipinski.

3.2. Penentuan ADMET

Pada penentuan ADMET, parameter yang dilihat antara lain nilai %HIA dan Caco-2 untuk melihat absorpsi, nilai %PPB dan BBB untuk melihat distribusi senyawa uji dalam tubuh serta penentuan toksisitas senyawa yang dapat diketahui dari sifat mutagen

Tabel 1. Hasil Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

No.	Nama Senyawa	Berat Molekul (< 500 Da)	Log P (<5)	Ikatan Hidrogen		Pelanggaran RO5	Drug Likeness
				Donor (<5)	Akseptor (< 10)		
1.	Donepezil (Senyawa Pembanding)	379.49	4	0	4	0	Suitable
2.	Ascorbic Acid	176.12	-1.28	4	6	0	Suitable
3.	Arecoline	155.19	0.80	0	3	0	Suitable
4.	Eugenol	164.20	2.25	1	2	0	Suitable
5.	Carvacrol	150.22	2.82	1	1	0	Suitable
6.	Riboflavin	376.36	-0.32	5	8	0	Suitable
7.	Thiamin	265.35	0.53	2	3	0	Suitable
8.	Quercetin	302.34	1.23	7	5	1	Suitable
9.	β -Caryophyllene	204.35	4.24	0	0	0	Suitable
10.	Phytol	296.53	6.22	1	1	1	Suitable
11.	β -Sitosterol	414.71	7.19	1	1	1	Suitable
12.	Hydroxychavicol	150.17	1.53	2	2	0	Suitable
13.	Niacin	123.12	0.32	1	3	0	Suitable
14.	Piperbetol	386.4	3.00	1	6	0	Suitable
15.	Piperin	285.34	3.03	0	3	0	Suitable
16.	Piperitol	154.25 Da	2.56	1	6	0	Suitable

serta karsinogen dari senyawa menggunakan *Ames test* dan *Rodent Carcinogenicity*. Hasil analisis secara online menggunakan situs PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) menunjukkan hasil seperti pada **Tabel 2**. Pada parameter distribusi, diketahui %PPB dan BBB yang tinggi dimiliki oleh eugenol, carvacrol, β -caryophyllene, phytol, β -sitosterol, hydroxychavicol. Pada penentuan toksisitas, diketahui hanya senyawa phytol dan β -sitosterol yang bersifat non-mutagen dan non-karsinogen terhadap tikus.

3.3. Preparasi Ligan dan Reseptor

Metode *fixed dose* digunakan pada uji toReseptor berupa Enzim Acetylcholinesterase dengan PDB ID 4EY7 seperti yang ditampilkan pada **Gambar 1** memiliki dua kompleks yang di dalamnya terdapat ligan alami berupa Donepezil atau 1-Benzyl-4-[(5,6-Dimethoxy-

1-Indanon-2-YL)Methyl]Piperidine yang ditunjukkan pada **Gambar 2**.

3.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Hasil validasi metode dapat dilihat pada **Tabel 3**. Pada **Tabel 3**, hasil validasi yang diperoleh menunjukkan *reference RMSD* yang bernilai ≤ 2 Å serta energi ikatan yang bernilai negatif jika grid yang digunakan diatur seperti yang tertera pada tabel sehingga tahap simulasi penambatan molekuler selanjutnya dilakukan menggunakan ketentuan grid box yang sama.

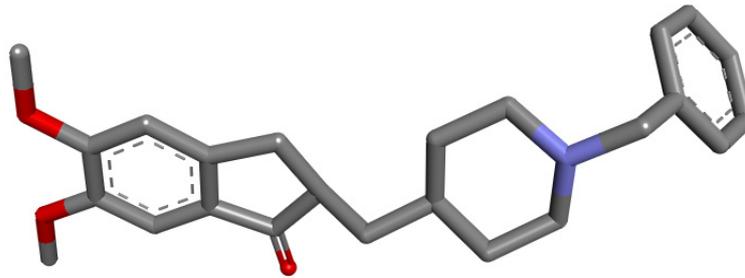
Simulasi penambatan molekuler yang telah dilakukan terhadap senyawa uji dan senyawa pembanding dengan reseptor AChE (PDB ID: 4EY7) menunjukkan bahwa beberapa senyawa uji yang terkandung dalam Daun Sirih (*Piper betle* L.) seperti, Eugenol, Riboflavin, Quercetin, Niacin, Piperin, dan

Tabel 2. Hasil Penentuan ADMET

No.	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksitas	
		%HIA	Caco-2 (nm/sec)	%PPB	BBB	Mutagen	Karsinogen
1.	Donepezil (Senyawa Pembanding)	97.95	55.51	84.62	0.19	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
2.	Ascorbic Acid	33.16	2.48	5.30	0.10	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
3.	Arecoline	100.00	26.32	8.14	1.05	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
4.	Eugenol	96.77	46.89	100.00	2.26	Mutagen	Mouse (+) Rat (+)
5.	Carvacrol	100.00	38.01	100.00	6.39	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
6.	Riboflavin	43.00	17.80	38.93	0.04	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
7.	Thiamin	91.11	5.44	9.07	0.03	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
8.	Quercetin	63.48	3.41	93.24	0.17	Mutagen	Mouse (-) Rat (+)
9.	β -Caryophyllene	100.00	23.63	100.00	13.32	Mutagen	Mouse (-) Rat (+)
10.	Phytol	100.00	37.63	100.00	19.08	Non-Mutagen	Mouse (+) Rat (-)
11.	β -Sitosterol	100.00	52.37	100.00	19.89	Non-Mutagen	Mouse (+) Rat (-)
12.	Hydroxychavicol	89.41	18.41	100.00	3.40	Mutagen	Mouse (+) Rat (-)
13.	Niacin	90.26	20.75	4.51	0.51	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)
14.	Piperbetol	96.85	27.19	85.69	0.02	Mutagen	Mouse (+) Rat (-)
15.	Piperin	98.18	52.38	90.45	0.05	Mutagen	Mouse (+) Rat (-)
16.	Piperitol	96.06	50.74	81.92	0.02	Mutagen	Mouse (-) Rat (-)



Gambar 1. Struktur Enzim AChE (PDB ID : 4EY7)



Gambar 2. Struktur Ligan Alami Donepezil dari Enzim AChE (PDB ID : 4EY7)

Piperitol telah berinteraksi dengan reseptor AChE melalui ikatan hidrogen yang terjadi pada residu asam amino yang sama seperti pada interaksi antara ligan alami (Donepezil) dengan reseptor AChE, yaitu asam amino PHE 295. Hasil simulasi penambatan molekuler kemudian divisualisasikan dalam bentuk 2D dan bentuk 3D menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020. Kemudian dilakukan visualisasi senyawa terbaik dari hasil simulasi penambatan molekuler ke dalam bentuk 2D dan 3D menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020.

4. Pembahasan

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam upaya pencarian kandidat obat baru yang berasal dari senyawa-senyawa metabolit tumbuhan adalah dengan studi *in-silico* menggunakan simulasi penambatan molekuler. Penambatan molekuler dapat memberikan gambaran terkait interaksi senyawa yang dijadikan ligan uji dengan reseptor yang ada pada tubuh manusia. Pada studi *in-silico* ini, dilakukan simulasi penambatan molekuler

terhadap senyawa-senyawa metabolit yang berasal dari daun sirih (*Piper betle* L.) dengan protein atau reseptor target berupa enzim Asetilkolinesterase (AChE) dengan PDB ID 4EY7. Enzim ini diketahui sebagai enzim yang dapat menghidrolisis karboksilat pada ikatan ester (EC 3.1.1.7). Pemilihan reseptor dengan kode tersebut dikarenakan enzim ini tidak bersifat mutagen dan di dalam kristal reseptor tersebut terdapat ligan alami berupa senyawa Donepezil yang diketahui sebagai senyawa yang dapat menjadi obat untuk penyakit Alzheimer sehingga letak kantung aktif dan asam amino yang menjadi tempat interaksi antara ligan dan reseptor dapat lebih mudah diketahui. Selain itu, resolusi dari enzim dengan PDB ID tersebut memiliki resolusi yang cukup tinggi, yaitu sebesar 2.35 Å dan terdapat pada organisme *Homo sapiens* atau manusia. Angka resolusi yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi atau baiknya resolusi yang dimiliki oleh kristal reseptor tersebut sehingga penggambaran strukturnya akan semakin mirip dengan struktur aslinya.⁶

Dalam mengevaluasi kemiripan senyawa uji dengan karakteristik obat oral yang

Tabel 3. Hasil Validasi

Ligan Alami	Binding Energy (KKal/mol)	Reference RMSD	KI (um)	Ukuran Grid Box	Koordinat Grid Box	Asam Amino
Donepezil	-11.45	0.67	0.004	40×24×34	x = -13.988 y = -43.906 z = 27.109	Ikatan Hidrogen : PHE295 Ikatan van der Waals : LEU289, VAL294, PHE297, GLY448, GLU202, SER203, GLY121, TYR124. Ikatan Lainnya : SER293, TYR72, TYR337, TRP86, HIS447, TRP286, TYR341, PHE338

mempunyai aktivitas biologis pada manusia, dilakukan penentuan *Lipinski's Rule of Five*. Aturan tersebut menyatakan bahwa senyawa uji tidak boleh memiliki berat molekul (BM) di atas 500 Da karena massa molekul yang tinggi mengurangi konsentrasi senyawa pada permukaan epitel usus sehingga mengurangi penyerapannya dalam usus serta sistem saraf pusat (SSP).¹⁵ Aturan tersebut pun menyatakan senyawa uji tidak memiliki nilai koefisien partisi (LogP) yang lebih dari 5 karena koefisien partisi yang tinggi menandakan senyawa bersifat lipofilik atau terikat sangat kuat dengan membran sehingga sulit untuk mengenali enzim target juga bersifat toksik. Namun nilai koefisien partisi senyawa yang terlalu kecil atau bernilai negatif juga tidak baik karena akan sulit untuk menembus membran lipid bilayer.¹⁶ Selain itu, jumlah ikatan donor dan ikatan hidrogen senyawa harus kurang dari 5 serta akseptor ikatan tidak lebih dari 10. Donor dan akseptor ikatan hidrogen merupakan besaran kapasitas ikatan hidrogen, dimana jumlah ikatan hidrogen yang tinggi dapat mengurangi partisi molekul dari fase larut air ke dalam membran bilayer lipid untuk permeasi dengan difusi pasif.¹⁷ Hasil *drug-likeness* dapat ditentukan dengan melihat jumlah parameter *Lipinski's Rule of Five* yang tidak terpenuhi oleh masing-masing senyawa. Jika satu parameter tidak terpenuhi masih dapat ditoleransi dan masih memenuhi *drug-likeness*. Akan tetapi, jika pelanggaran atas parameter *Lipinski's Rule of Five* yang dimiliki oleh suatu senyawa bernilai >1 maka senyawa tersebut dianggap tidak memenuhi syarat untuk dijadikan kandidat obat dalam bentuk sediaan oral.^{18, 19} Prediksi *Lipinski's Rule of Five* menunjukkan 15 senyawa yang memenuhi kriteria, dimana seluruh senyawa uji menunjukkan hasil tidak terdapatnya pelanggaran sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat dijadikan kandidat obat oral.

Penapisan berdasarkan prediksi ADMET dilakukan dengan tujuan menentukan kandidat obat yang tidak beracun serta memiliki profil farmakokinetik oral yang baik. Penapisan ini mengamati absorpsi, distribusi, serta toksisitas senyawa uji untuk menghindari kegagalan pada tahap-tahap selanjutnya.

Prediksi absorpsi dilakukan dengan tujuan memastikan senyawa obat yang digunakan memiliki penyerapan serta permeabilitas yang baik pada tubuh manusia. Prediksi ini terdiri dari prediksi HIA (*Human Intestinal Absorption*) dan Caco-2 (*Human colon adenocarcinoma*). HIA merupakan hasil penjumlahan dari bioavailabilitas dan absorpsi yang dievaluasi dari rasio ekskresi melalui urin, empedu, serta feses.²⁰ Berdasarkan persentase HIA, absorpsi suatu senyawa dapat diketahui yaitu nilai HIA 0-20% menunjukkan absorpsi senyawa yang kurang baik, HIA 20-70% menunjukkan absorpsi senyawa tergolong sedang, dan nilai HIA sebesar 70-100% menunjukkan absorpsi senyawa yang baik.²¹ Dari kelima belas senyawa yang diuji, diketahui ada 2 senyawa yang memiliki daya penyerapan sedang, sedangkan untuk 13 senyawa lainnya memiliki daya penyerap yang baik, sedangkan untuk senyawa pembanding yang digunakan, juga memiliki daya penyerapan yang baik. Selanjutnya, prediksi Caco-2 yang merupakan model *in vitro* agar dapat mengetahui transport obat melalui epitel intestinal yang berasal dari adenocarcinoma usus manusia yang memiliki jalur transportasi ganda.²² Nilai Caco-2 < 4 nm/sec menunjukkan permeabilitas senyawa yang rendah, nilai Caco-2 sebesar 4-70 nm/sec menunjukkan permeabilitas senyawa yang sedang, dan nilai Caco-2 > 70 nm/sec menunjukkan permeabilitas senyawa yang tinggi.²¹ Hasil prediksi dengan Caco-2 menunjukkan senyawa uji memiliki permeabilitas cenderung rendah ke sedang, sedangkan untuk senyawa pembanding memiliki permeabilitas sedang. Berdasarkan hasil prediksi, senyawa obat uji memiliki daya serap dan permeabilitas yang cukup baik meskipun terdapat beberapa senyawa yang masih menunjukkan tingkat permeabilitas yang rendah.

Prediksi distribusi terdiri dari PPB (*Plasma Protein Binding*) dan BBB (*Blood Brain Barrier*). PPB merupakan derajat distribusi pengikatan protein dalam darah, sehingga tubuh dapat mendistribusikan darah yang telah terikat senyawa obat dimana nilai PPB < 90% menunjukkan ikatan yang lemah dan

nilai PPB sebesar $> 90\%$ menunjukkan ikatan yang kuat.²⁰ BBB merupakan kemampuan yang memungkinkan pembuluh darah melakukan vaskularisasi sistem saraf pusat (SSP) yang mengatur dengan ketat pergerakan ion, molekul, dan sel antara darah dan otak.²¹ Nilai BBB < 0.1 menunjukkan senyawa memiliki daya penetrasi SSP yang rendah, nilai BBB sebesar $0.1-2$ menunjukkan senyawa memiliki daya penetrasi SPP yang sedang, dan BBB > 2 menunjukkan daya penetrasi yang tinggi (*high CNS absorption*).²³ Ikatan obat yang bersifat *irreversible* dapat terjadi akibat ikatan kimia yang kuat seperti ikatan kovalen yang dapat menyebabkan munculnya toksisitas obat tertentu baik yang muncul dalam jangka waktu panjang maupun pendek. Secara umum obat-obat berikatan secara reversibel yang terjadi akibat ikatan kimia yang lemah seperti ikatan hidrogen dan Van der Waals.²⁴ Semakin besar kemampuan ikatan protein plasma maka distribusi senyawa obat dalam darah juga semakin baik.²⁵

Prediksi toksisitas bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa yang diuji memiliki sifat toksik terhadap tubuh yang diamati dengan Tes Ames. Tes Ames ini sendiri merupakan metode sederhana untuk menguji sifat senyawa berupa sifat mutagenik dan karsinogenik sebagai *Frameshift Mutagen*.²⁶ Hasil Tes Ames terdiri dari 2 kriteria yaitu hasil positif dan negatif. Hasil positif menunjukkan senyawa uji bersifat mutagen dan mampu memicu terjadinya mutasi pada struktur DNA dalam sel, sedangkan nilai negatif menunjukkan senyawa uji bersifat sebaliknya.²⁷ Selain Tes Ames, dilakukan uji karsinogenisitas yang akan menghasilkan positif apabila senyawa termasuk genotoksik dimana terdapat aktivitas karsinogenik, *evidence of carcinogenic activity*, sedangkan hasil negatif menunjukkan senyawa termasuk non-genotoksik serta tidak terbukti adanya aktivitas karsinogenik.²⁸

Pada tahap preparasi, kristal reseptor dipisahkan terlebih dahulu dari molekul air karena pada kristal reseptor tersebut masih terdapat molekul pelarut yang dapat mengganggu proses penambatan ligan dengan reseptor serta untuk memastikan

ligan dapat benar-benar berinteraksi dengan reseptor. Hal ini dikarenakan adanya kemungkinan bahwa ligan air dapat terikat pada sisi aktif reseptor sehingga menghalangi ligan lain untuk berikatan.²⁷ Setelah itu, dilakukan pemisahan antara ligan alami dengan reseptornya lalu masing-masingnya dipreparasi lebih lanjut. Struktur reseptor dipreparasi dengan menambahkan atom Hidrogen karena diketahui reseptor pada PDB yang digunakan dipreparasi melalui *X-ray diffraction* sehingga atom Hidrogen yang mungkin ada pada struktur reseptor menjadi tidak terlihat. Penambahan Hidrogen bertujuan agar posisi atom Hidrogen pada struktur reseptor menjadi optimal dan agar dapat ditentukan posisi yang diinginkan dari atom-atom secara energetik. Pada ligan uji juga dilakukan minimalisasi energi yang tujuannya adalah untuk mendapatkan struktur senyawa dengan penggunaan energi antar atom yang tinggi sehingga dapat meminimalkan efek sterik berenergi tinggi dari struktur serta untuk menghindari adanya kontak Van der Waals yang tidak sesuai dari ligan.²⁹

Setelah diperoleh 15 senyawa yang memenuhi kriteria parameter ADMET serta *Lipinski's Rule of Five*, dilakukan penambatan molekuler untuk melihat afinitas pengikatan antara senyawa uji dengan reseptor asetilkolinesterase. Proses penambatan molekuler dilakukan dengan menentukan posisi dan ukuran *grid box* yang akan digunakan terlebih dahulu melalui tahap validasi. *Grid box* berfungsi untuk melihat reseptor yang akan ditambatkan dari koordinat x , y dan z sehingga konformasi energi terendah dari ligan dapat diketahui dan semakin rendah nilai RMSD (≤ 2) dan nilai energi ikatan yang dihasilkan oleh suatu *grid box* menunjukkan hasil penambatan ulang bersifat valid.³⁰ Nilai RMSD dinilai dari hasil superposisi dari *native ligand* dan hasil *redocking*. Penilaian RMSD bertujuan menentukan kemampuan pereplikasian metode yang digunakan secara komputasi untuk prosedur eksperimental.

Setelah mendapatkan nilai ukuran dan posisi *grid box* yang tepat, dilakukan proses penambatan molekuler terhadap molekul

senyawa uji (ligan uji) dan donepezil sebagai ligan pembanding. Donepezil merupakan obat untuk mengatasi gejala demensia pada pasien Alzheimer. Parameter yang diamati dari hasil penambatan molekuler ini adalah jumlah ikatan hidrogen, nilai energi bebas ikatan (ΔG), dan nilai konstanta inhibisi (K_i).³¹ Parameter-parameter tersebut memengaruhi afinitas atau kemampuan ligan untuk berikatan dengan reseptor. Semakin banyak jumlah ikatan hidrogen yang sama antara ligan uji dengan ligan alami menunjukkan senyawa yang menjadi ligan uji tersebut mampu bersifat menghambat aktivitas dari protein target atau reseptor melalui penggantian posisi ligan alami dengan ligan uji. Nilai ΔG yang kecil atau minus menandakan adanya kemungkinan terbentuknya ikatan antara ligan dan makromolekul. Nilai K_i menandakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan setengah dari nilai penghambatan maksimum. Nilai K_i yang kecil mengakibatkan afinitas ligan terhadap makromolekul yang semakin kuat.³²

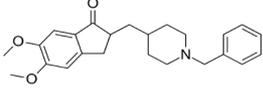
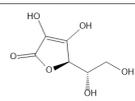
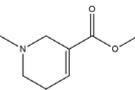
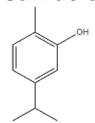
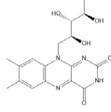
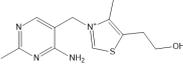
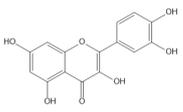
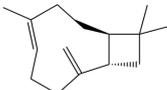
Dari hasil penambatan molekuler pada **Tabel 4**, dapat dilihat senyawa dengan nilai ΔG dan K_i terendah, yaitu β -Sitosterol dengan nilai ΔG sebesar -11,45 dan K_i 0.04 μM . Akan tetapi, residu asam amino ikatan hidrogen antara ligan dan reseptor pada β -Sitosterol (SER 293), tidak sama dengan residu asam amino ikatan hidrogen antara ligan alami atau ligan pembanding dengan reseptor (PHE 295). Ikatan yang sama dengan ikatan pada ligan alami atau ligan pembanding pada β -Sitosterol hanya terdapat pada ikatan pi (TRP 86, TYR 337, PHE 338, TRP 286, TYR 341). Menurut literatur, sub-situs untuk residu asam amino seperti TRP 86, TYR 337, PHE 338, dan TYR 341 dapat menyebabkan terjadinya interaksi antara ligan dan reseptor melalui ikatan hidrofobik.¹⁰ Menurut prediksi Lipinski, β -Sitosterol memiliki pelanggaran terhadap parameter Log P (>5) yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat sangat lipofilik sehingga cenderung bersifat toksik karena terikat kuat dengan membran dan sulit mengenali enzim target.

Oleh karena itu, senyawa atau ligan uji yang paling baik diantara ke 15 ligan uji

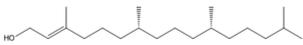
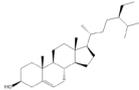
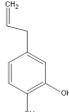
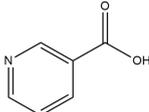
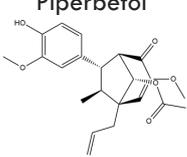
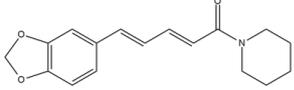
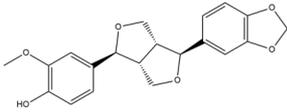
yang dianalisis menggunakan penambatan molekuler, prediksi Lipinski, dan ADMET dengan hasil paling baik diperoleh dari senyawa Piperin. Hal ini dibuktikan dengan adanya residu asam amino yang sama pada ikatan hidrogen antara Piperin dengan reseptor dan antara ligan alami atau ligan pembanding dengan reseptor, yaitu pada asam amino PHE 295 dengan nilai *Binding Energy* dan K_i berturut-turut sebesar -9.97 kkal/mol dan 0.05 μM . Hasil tersebut dapat dilihat melalui hasil visualisasi pada **Tabel 5**. Senyawa lain seperti piperitol memang memiliki residu asam amino yang sama (PHE 295) serta *binding energy* yang lebih kecil daripada piperin. Akan tetapi, piperitol memiliki nilai K_i yang jauh lebih besar dibanding nilai K_i yang dimiliki oleh piperin yang menunjukkan bahwa senyawa yang lebih efektif dalam membentuk afinitas ligan dengan makromolekul adalah piperin.³²

Pada prediksi ADMET, senyawa Piperin juga menunjukkan nilai %HIA yang baik yaitu sebesar 98.18% dan nilai permeabilitas Caco-2 yang termasuk ke dalam kategori sedang dengan nilai 52.383 nm/sec. Pada uji distribusi, %PPB menunjukkan nilai yang baik yaitu sebesar 90.448% yang menunjukkan obat memiliki kemampuan distribusi yang baik akibat kuatnya ikatan protein plasma. Akan tetapi, nilai BBB senyawa ini tergolong rendah karena bernilai 0.05% yang menandakan penetrasi obat ke sawar otak kurang baik. Selain parameter di atas, seluruh profil fisikokimia dan hasil penambatan molekuler senyawa Piperin memberikan hasil yang paling baik di antara senyawa-senyawa lain. Sehingga diketahui senyawa Piperin memiliki potensi yang paling baik sebagai kandidat obat untuk mengobati Alzheimer melalui inhibisi enzim Acetylcholinesterase. Hal ini sesuai dengan hipotesis awal bahwa Piperin adalah kandidat terkuat obat Alzheimer karena memiliki aktivitas inhibisi asetilkolinesterase atau meningkatkan sistem kolinergik pada otak. Akan tetapi, perlu dilakukan modifikasi pada preformulasi Piperin mengingat kemampuan penetrasinya terhadap sawar otak cukup rendah.

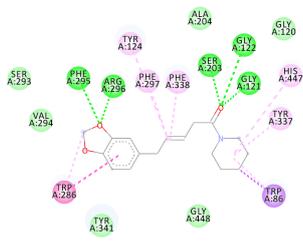
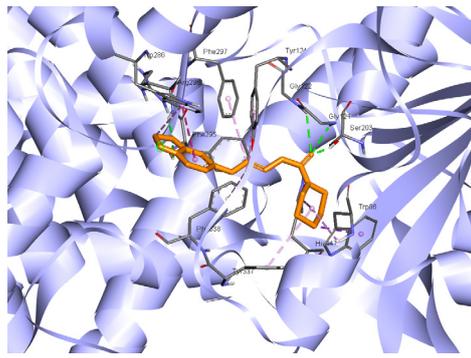
Tabel 4. Hasil Penambatan Molekuler

Senyawa	Binding Energy (KKal/mol)	KI (um)	Interaksi dengan Asam Amino		
			Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Ikatan Lainnya
Donepezil (Senyawa Pemandang) 	-11.46	0.004	PHE295	LEU289, VAL294, PHE297, GLY448, GLU202, SER203, GLY121, TYR124	SER293, TYR72, TYR337, TRP86, HIS447, TRP286, TYR341, PHE338
Ascorbic Acid 	-5.14	170.81	TYR124, ARG296	-	-
Arecoline 	-5.91	46.31	ARG296	-	SER293, TYR341, PHE338, LEU289, TRP286
Eugenol 	-6.04	37.44	PHE295, ARG296	-	TYR341, VAL294, PHE297, LEU289, PHE338, SER293, TYR72, TRP286
Carvacrol 	-6.44	19.18	ARG296	-	PHE338, TYR341, PHE297, TRP286, VAL294
Riboflavin 	-8.71	0.41	PHE295, ARG296, TYR124, ASP74	PHE297, LEU289, VAL294, TYR72	TRP86, TYR337, HIS447, PHE338, SER293, TRP286, TYR341
Thiamin 	-7.62	2.59	AR 296, TYR341	-	TYR337, PHE338, PHE297, VAL294, TYR124, TRP86
Quercetin 	-8.45	0.64	PHE295, ARG296, TYR341, ASP74	LEU289, SER293, GLY342, TYR124, THR83, TRP86, TYR337, PHE338, PHE297, TRP286	VAL294
β -Caryophyllene 	-7.97	1.44	-	-	PHE295, PHE297, PHE338, TYR124, HIS447, TYR337, TRP86

Tabel 4. Hasil Penambatan Molekuler

Senyawa	Binding Energy (KKal/mol)	KI (μ m)	Interaksi dengan Asam Amino		
			Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Ikatan Lainnya
Phytol 	-9.12	0.21	ARG296	-	PHE295, PHE297, PHE338, TYR124, TYR337, HIS447, VAL294, TRP286, TRP86
β -Sitosterol 	-11.45	0.004	SER293	-	TRP86, TYR337, PHE338, VAL294, TRP286, TYR341, HIS447
Hydroxychavicol 	-5.83	53.03	ARG296, SER293	LEU289, PHE297, TYR124	PHE295, TRP286, TYR341, PHE338, TYR337, VAL294
Niacin 	-4.21	819.61	TYR124, ARG296	PHE295, LEU289, TRP286, SER293, PHE297, SER203, GLY121, GLY122,	TYR341, PHE338, VAL294
Piperbetol 	-10.94	0.01	TYR124, TYR337, ARG296	PHE295, TRP286, PHE297, GLY448, TRP86, THR83, ASP74	SER293, TYR341, VAL294, PHE338, HIS447
Piperin 	-9.97	0.05	PHE295, ARG296, SER203, GLY122, GLY121	SER293, VAL294, ALA204, GLY120, GLY448, TYR341, PHE297, ARG296, GLY122, GLY121,	TYR124, PHE297, PHE338, HIS447, TYR337, TRP286, TRP86
Piperitol 	-11.17	6.54	PHE295, GLU202	GLY122, GLY121, ALA204, SER203, GLY120, ILE451, GLY448, TYR124	SER293, PHE338, HIS447, TYR337, TYR341, TRP286, VAL294

Tabel 5. Hasil Visualisasi Penambatan Molekuler pada Piperin

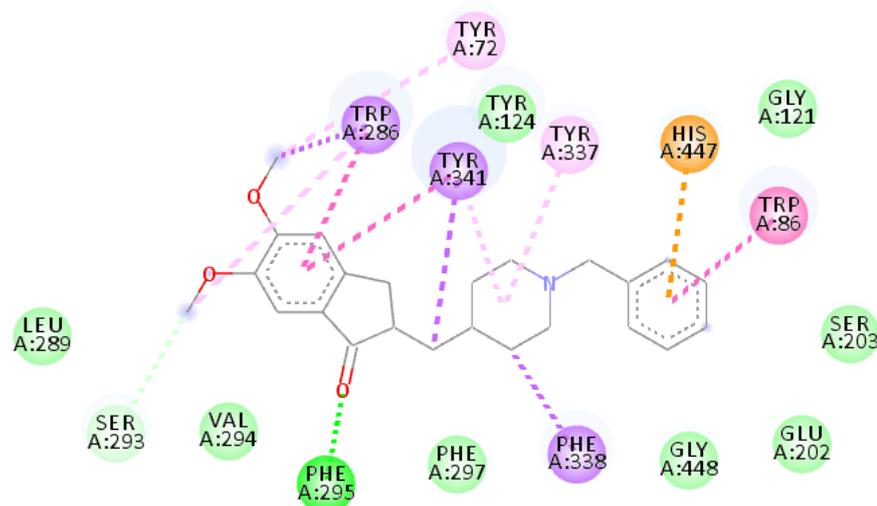
Visualisasi 2D	Visualisasi 3D
 <p data-bbox="199 577 494 694"> Keterangan: ■ Ikatan van der Waals ■ Ikatan Hidrogen ■ Ikatan Pi </p>	 <p data-bbox="813 645 1380 694"> Keterangan: Interaksi antara Piperin dengan enzim Acetylcholinesterase </p>

5. Kesimpulan

Berdasarkan studi *in-silico* menggunakan simulasi penambatan molekuler, analisis sifat fisikokimia dan toksisitas, diketahui senyawa metabolit sekunder Piperin pada Daun Sirih (*Piper betle* L.) memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor terhadap enzim Acetylcholinesterase dengan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi terbaik, yaitu berturut-turut sebesar -9.97 kkal/mol dan 0.049 um, dengan ikatan hidrogen yang terjadi pada residu asam amino PHE 295.

Daftar Pustaka

1. Christensen A, Pike CJ. APOE Genotype Affect Metabolic and Alzheimer-related Outcomes Induced by Western Diet in Female EFAD Mice. *The FASEB Journal*. 2019;33(3): 4054-4066.
2. Aguila JLD, Koboldt DC, Black K, Chasse R, Norton J, Wilson RK, et al. Alzheimer's Disease: Rare Variants with Large Effect Sizes. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2015;33(1): 49-55
3. Thakur AJ, Kamboj P, Goswami K, Ahuja K. Pathophysiology and Management of Alzheimer's disease: an overview. *J Anal Pharm Res*. 2018;7(2): 226-235.
4. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary, E.N., Love, J., et.al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012; 55(22): 10282-10286.
5. Santos, T. C. D., Gomes, T. M., Pinto, B. A. S., Camara, A. L., & Paes, A. M. D. A. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for



Gambar 3. Visualisasi 2D terhadap Interaksi Ligan-Reseptor Hasil Validasi

- Alzheimer's Disease Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9, 1192
- Kreutzer AG, Hamza IL, Spencer RK, Nowick JS. X-ray Crystallographic Structures of a Trimer, Dodecamer, and Annular Pore Formed by an A β 17-36 β -Hairpin. *Journal of the American Chemical Society*. 2016;136: 4634-4642.
 - Damayanti R, Mulyono. *Khasiat & Manfaat Daun Sirih: Obat Mujarab dari Masa ke Masa*. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2003.
 - Depkes RI. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*. Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000.
 - Depkes RI. *Materia Medika Indonesia, Jilid IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1980.
 - Debnath M, Das S, Bhowmick S, Karak S, Saha A, De B. Anti-Alzheimer's Potential of Different Varieties of Piper betle Leaves and Molecular Docking Analyses of Metabolites. *Free Radicals and Antioxidants*. 2021;11(1):13-18.
 - Konrath EL, Passos Cdos S, Klein LC Jr, Henriques AT. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(12):1701-25.
 - Elnaggar YS, Etman SM, Abdelmonsif DA, Abdallah OY. Intranasal Piperine-Loaded Chitosan Nanoparticles as Brain-Targeted Therapy in Alzheimer's Disease: Optimization, Biological Efficacy, and Potential Toxicity. *J Pharm Sci*. 2015;104(10):3544-56.
 - Lee, J. H., Jeong, S. K., Kim, B. C., Park, K. W., Dash, A. Donepezil across the spectrum of Alzheimer's disease: dose optimization and clinical relevance. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2015; Vol. 131: (5): 259-267
 - Pratama, M.R.F. dan Siswandono, S. Number of Runs Variations on AutoDock 4 Do Not Have a Significant Effect on RMSD from Docking Result. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020; Vol. 8 (6):476-480
 - Shay, A. C., Powers, J., Doescher, T. A. *Adult-Gerontology Clinical Nurse Specialist Certification Review*. Newyork: Springer Publishing; 2021
 - Hacker, M., Bachman, K., Messer, W. *Pharmacology: Principles and Practice*. London: Elsevier; 2009
 - Mitra, A. K., Kwatra, D., Vadlapudi, A. D. *Drug Delivery*. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2015
 - Lipinski, CA. Lead- and Drug-Like Compounds: The Rule-Of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004; 1(4) : 337-341.
 - Liu Y-Ya, Feng X-Yan, Jia W-Qing, Jing Z, Xu W-Ren, & Cheng X-Chao. Identification of Novel PI3K Inhibitors by Docking, ADMET Prediction and Molecular Dynamics Simulations. *Computational Biology and Chemistry*. 2019; 78 : 190-204.
 - Prasetiawati R, Suherman M, Permana B, Rahmawati. Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. *IJPST*. 2021;8(1): 8-20.
 - Hasan HMA, Khalid HAA, and Abdulsayid F. Infrared(IR) Characterization and Physicochemical Properties of Schiff Base Compound Obtained by the Reaction Between 4- Hydroxy-3-methoxy Benzaldehyde and 2- Amino-3-methylbutanoic Acid. *Journal of Research in Pharmaceutical Science*. 2021; 7 (3) : 8-12.
 - Nursamsiar, Toding AT, Awaluddin A. Studi In Silico Senyawa Turunan Analog Kalkon dan Pirimidin sebagai Antiinflamasi: Prediksi Absorpsi, Distribusi, dan Toksisitas. *Pharmacy*. 2016; 13(1): 92-100.
 - Suherman M, Prasetiawati R, Ramdani D. Virtual Screening Of Tamarind Active Compounds (Tamarindus Indica L.) On Selective Inhibitor Siklooksigenase-2. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. 2020;11(2): 135
 - Shargel L, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics 7th Edition*. New York : McGraw Hill, 2016; 273.

25. Nusantoro Y, Fadlan A. Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoilhidrazon dan Kompleks Logam Transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kimindo*. 2020; 5(2): 114-126.
26. Hsu KH, Su BH, Tu YS, Lin OA, and Tseng YJ. Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. *PLoS One*. 2016; 11(2).
27. Noviardi HME, Ramadhan R. Penapisan Molekular Kandidat Obat Sintetik Tuberkulosis terhadap Protein Tirosin Kinase *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Farmamedika*. 2020; 5(2): 60-69
28. Noviardi HME, Ramadhan R. Penapisan Molekular Kandidat Obat Sintetik Tuberkulosis terhadap Protein Tirosin Kinase *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Farmamedika*. 2020; 5(2): 60-69
29. Muttaqin FZ, Ismail H, dan Muhammad HN. Studi Molecular Docking, Molecular Dynamic, dan Prediksi Toksisitas Senyawa Turunan Alkaloid Naftiridin Sebagai Inhibitor Protein Kasein Kinase 2-A pada Kanker Leukemia. *Pharmacoscript*. 2019; 2(1): 49-64.
30. Chang Y, Min J, Jarusiewicz J.A., Actis M, Bradford S.Y.C, Mayasundari A, Yang L, Chepyala D, Alcock L, Roberts K.G, Nithianantham S, Maxwell D, Rowland L, Larsen R, Seth A, Goto H, Imamura T, Akahane K & Mullighan C.G. Degradation of Janus Kinase CRLF2-rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2021;138(23):2301-2302
31. Arwansyah A, Ambarsari L, Sumaryada TI. Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Current Biochemistry*. 2014; 1(1): 11-19
32. Mardianingrum R, Herlina T, & Supratman U. Isolasi dan Molecular Docking Senyawa 6,7-Dihidro-17-Hidroksierisotrin dari Daun Dadap Belendung (*Erythrina poeppigiana*) terhadap Aktivitas Sitotoksik Antikanker Payudara MCF-7. *Jurnal Chimica et Natura Acta*. 2015;3(3):90-93