

In Silico Study of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Bioactive Compounds as Acetylcholinesterase (AChE) Enzyme Inhibitors in Alzheimer's Disease

Maitsa A. Fakhirah*, Nadya D. Banowati, Yuni Nurjanah, Siti N. Nurulaini, Salsabila Athaya, Muchtaridi Muchtaridi, Agus Rusdin, Harsoning T. Mardisanutol

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

Submitted 13 June 2023; Revised 07 July 2023; Accepted 15 August 2023; Published 30 August 2023

*Corresponding author: maitsa21001@mail.unpad.ac.id

Abstract

Alzheimer's is a neurodegenerative disease characterized by memory impairment, language capability, and other cognitive abilities caused by acetylcholine inactivation by acetylcholinesterase (AChE). Compounds that have acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity are key targets in the treatment of Alzheimer's. In this research, an in silico study was conducted on compounds in black pepper fruit (*Piper nigrum* L.) to find out whether these compounds could be used as drug candidates in the treatment of Alzheimer's using the Lipinski's Rule of Five method, ADMET determination, structure preparation, and molecular docking. Tests were carried out with LigandScout software to perform pharmacophore modeling, BIOVIA Discovery Studio 2021 for preparation of natural ligands and target receptors and for visualization of molecular docking results, Chemdraw 22.0.0 64-bit to draw the structure of the tested compounds, Chem3D 22.0.0 64-bit to minimize its energy, and the AutoDockTools-1.5.7 application to perform molecular docking analysis. From the analysis of the ten test compounds namely, piperine, piperidine, chavicine, alpha-phellandrene, caryophyllene, ethoxyallene, limonene, quercetin, eugenol, kaempferol, and by using Donepezil as comparator. Limonene is the best possible drug candidate because the bond energies and inhibition constants are -11.07 kcal/mol and 5.40 nM with hydrogen bonding that occurs in the PHE295 and SER293 amino acid residue.

Keywords: Alzheimer, Acetylcholinesterase inhibitor, Black pepper (*Piper nigrum* L.), Molecular Docking

Studi *In Silico* Senyawa Bioaktif Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) sebagai Inhibitor Enzim Asetilkolinesterase (AChE) pada Penyakit Alzheimer

Abstrak

Alzheimer adalah penyakit neurodegeneratif yang ditandai dengan penurunan daya ingat, kemampuan bahasa, dan kemampuan kognitif lain yang disebabkan oleh inaktivasi asetilkolin oleh asetilkolinesterase (AChE). Senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan asetilkolinesterase (AChE) adalah target kunci dalam pengobatan alzheimer. Pada penelitian ini, studi in silico dilakukan terhadap senyawa dalam Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) untuk mengetahui apakah senyawa tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat obat dalam pengobatan Alzheimer menggunakan metode Lipinski's Rule of Five, penentuan ADMET, preparasi struktur, dan penambatan molekuler. Pengujian dilakukan dengan perangkat lunak LigandScout untuk melakukan pemodelan farmakofor, BIOVIA Discovery Studio 2021 untuk preparasi ligan alami dan reseptor target serta untuk visualisasi hasil penambatan molekuler, Chemdraw 22.0.0 64-bit untuk menggambar struktur senyawa yang diujikan, Chem3D 22.0.0 64-bit untuk meminimalkan energinya, dan Aplikasi AutoDockTools-1.5.7 untuk melakukan analisis penambatan molekuler. Dari hasil analisis sepuluh senyawa uji yaitu, piperin, piperidin, chavicine, alpha-phellandrene, caryophyllene, ethoxyallene, limonen, kuersetin, eugenol, kaempferol, dan dengan menggunakan donepezil sebagai senyawa pembanding. Senyawa limonen merupakan kandidat obat yang paling baik karena memiliki nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi berturut-turut sebesar -11,07 kkal/mol dan 5,40 nM dengan ikatan hidrogen yang terjadi pada residu asam amino PHE295 dan SER293.

Kata Kunci: Alzheimer, Asetilkolinesterase inhibitor, Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.), Penambatan Molekuler

1. Pendahuluan

Alzheimer merupakan salah satu penyakit neurodegeneratif yang gejalanya dapat berupa penurunan daya ingat, kemampuan dalam pemecahan masalah, kemampuan bahasa, serta penurunan kemampuan kognitif lain yang terjadi akibat terganggunya neuron di daerah otak yang terlibat dalam pembentukan ingatan baru dan kemampuan kognitif lainnya.¹ Inaktivasi asetilkolin oleh asetilkolinesterase sehingga melepaskan kolin dan asetat menjadi penyebab penyakit demensia termasuk alzheimer.² Prevalensi penyakit alzheimer tergolong pesat di dunia. Berdasarkan data dari WHO tahun 2023, lebih dari 55 juta jiwa mengalami demensia di seluruh dunia dan ada hampir 10 juta kasus baru setiap tahunnya, dengan 60-70% diantaranya adalah penyakit alzheimer.³ Penyakit alzheimer ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti faktor genetik, lingkungan, dan gaya hidup.⁴ Maka dari itu, perlu dilakukan pencegahan dan juga pengobatan untuk menekan angka prevalensi penyakit alzheimer terutama di Indonesia.

Saat ini, terapi penyakit alzheimer yang tersedia hanya berupa terapi simptomatik yang dapat memperbaiki fungsi kognitif pasien, tidak untuk memperlambat atau bahkan menghentikan perkembangan penyakit ini. Obat yang direkomendasikan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) sebagai terapi farmakologi dari alzheimer adalah inhibitor kolinesterase yaitu donepezil dan juga antagonis N-methyl-D-aspartate (NMDA) yaitu memantine.⁵ Donepezil merupakan dasar dari terapi simptomatik yang telah digunakan lebih dari 20 tahun untuk mengatasi gejala dari penyakit alzheimer.⁶ Namun, terapi alzheimer dengan pemberian obat-obat inhibitor kolinesterase dan antagonis NMDA ini hanya bertujuan untuk menekan laju progresifitas penyakit dan juga memberikan rasa aman pada pasien dan keluarga.⁷

Patofisiologi dari perkembangan penyakit alzheimer melibatkan neuron dan degenerasi sinapsis akibat dari agregasi protein beta-amyloid ($A\beta$) dan peradangan saraf, kerusakan mitokondria, serta stres

oksidatif yang menghambat beberapa jalur pensinyalan neurotransmitter. Selain itu, disfungsi kolinergik juga berkaitan dengan penurunan kognitif dini yang ditemukan pada pasien alzheimer.⁸ Adanya disfungsi neuron kolinergik, terutama di daerah limbik dan neokortikal yang merupakan daerah penting untuk fungsi kognitif seperti memori dan pembelajaran, menyebabkan berkurangnya produksi asetilkolin (ACh). Maka dari itu, saat ini neurotransmisi kolinergik masih menjadi pendekatan utama dalam terapi simptomatik penyakit alzheimer dimana penghambatan asetilkolinesterase (AChE), yaitu enzim yang bertanggung jawab untuk metabolisme asetilkolin (ACh) adalah target kunci dalam pengobatan alzheimer.⁹

Buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) merupakan tanaman dari famili Piperaceae yang merupakan tanaman asli India dan sudah dibudidayakan secara luas di daerah tropis. Indonesia merupakan negara yang termasuk kedalam penghasil serta pengekspor lada hitam tertinggi di dunia.¹⁰ Lada hitam mengandung piperin, asam linoleat, asam oleat, dan asam palmitat.¹¹ Namun, piperin adalah salah satu kandungan yang diduga paling efektif dalam buah lada hitam. Piperin ($C_{17}H_{19}NO_3$) atau (E,E)-1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl] piperidin termasuk kedalam senyawa golongan alkaloid yang berbentuk prisma monosiklik dari alkohol yang memiliki titik lebur 128-130°C. Senyawa piperin bersifat mudah larut dalam etanol dan eter, namun hampir tidak larut dalam air. Kandungan piperin pada buah lada hitam yang dianalisis menggunakan HPLC pada penelitian sebelumnya mempunyai kadar 3-6%.¹⁰

Buah lada hitam tidak terlepas dari ragam senyawa aktif yang terkandung sehingga memiliki efek farmakologi yang beragam. Seperti caryophyllene yang memiliki efek farmakologi yang signifikan yaitu, antioksidan, antikanker, kardio protektif, antiinflamasi, hepatoprotektif, nefro protektif, gastroprotective, antimikroba, dan imunomodulator. Selain itu, senyawa *chavicine* yang terkandung dalam buah lada hitam juga memiliki efek farmakologi pada peningkatan

memori, sehingga dapat menjadi kandidat potensial untuk gangguan neurodegeneratif lainnya. Serta senyawa piperin, memiliki efek farmakologi untuk menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase, sehingga mengurangi kadar glukosa darah, serta mengurangi berbagai jenis radikal bebas untuk mencegah stres oksidatif.¹² Selain itu, buah lada hitam juga mengandung minyak atsiri yang penyusun utamanya yaitu *trans-caryophyllene* (23,77%), limonen (18,20%), dan *delta-3-carene* (13,51%).¹³

Pengobatan alzheimer yang saat ini digunakan masih belum memuaskan, karena obat-obatan yang tersedia saat ini, seperti inhibitor AChE, modulator reseptor NMDA, dan agen neuroprotektif dapat mengurangi gejala dan menunda perkembangan penyakit, tetapi belum dapat mencegah penyebab dari alzheimer.¹⁴ Oleh karena itu, penelitian monoterpen dan monoterpenoid dalam buah lada hitam merupakan kelompok kandidat obat yang menarik untuk diteliti karena diduga senyawa tersebut mempengaruhi patogenesis penyakit alzheimer dalam beberapa level target.¹⁴ Potensi terapeutik monoterpen dan monoterpenoid dalam pengobatan penyakit alzheimer dilandasi pada penghambatan nefrotoksisitas yang diinduksi $A\beta$, penurunan fosforilasi protein, pelemahan stres oksidatif dengan meningkatkan pertahanan antioksidan, pengurangan peradangan saraf, pemulihan fungsi mitokondria, inisiasi dengan penghambatan simultan gen dan apoptosis protein, serta penghambatan AChE.¹⁴ Limonen merupakan senyawa monoterpen yang telah diteliti dapat menekan kematian sel saraf dan menurunkan tingkat spesies oksigen reaktif (ROS) yang berdampak negatif pada fosforilasi protein. Selain itu, limonene memiliki kerangka hidrokarbon yang dianggap sebagai ligan hidrofobik yang dapat berkontribusi pada interaksi dengan situs aktif hidrofobik AChE, sehingga limonen diperkirakan memiliki aktivitas anti AChE. Berdasarkan paparan tersebut, hipotesis awal dari penelitian ini adalah limonen sebagai kandidat terkuat sebagai terapi alzheimer.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk meneliti potensi buah lada hitam (*Piper nigrum*

L.) sebagai kandidat obat untuk penyakit alzheimer dengan menggunakan metode studi in silico. Buah lada hitam dipilih sebagai kandidat karena buah lada hitam merupakan tanaman yang diketahui memiliki beragam efek farmakologis namun belum pernah diteliti sebagai terapi alzheimer dan juga ketersediaan buah lada hitam pun banyak terdapat di alam. Senyawa pada buah lada hitam yang diuji pada penelitian ini yaitu senyawa yang terkandung di dalam buah lada hitam diantaranya piperin, piperidin, *chavicine*, *alpha-phellandrene*, *caryophyllene*, *ethoxyallene*, limonen, kuersetin, eugenol, dan kaempferol. Berdasarkan pemaparan diatas, protein target yang dipilih adalah enzim asetilkolinesterase (AChE) dengan kode PDB 4EY7. Sedangkan, donepezil digunakan sebagai senyawa pembanding karena donepezil merupakan penghambat asetilkolinesterase yang disetujui untuk digunakan di seluruh spektrum penyakit alzheimer dengan derajat ringan, sedang, maupun berat.¹⁵

2. Metode

2.1. Alat

Perangkat keras berupa laptop pribadi dengan spesifikasi processor 11th Gen Intel® Core™ i3-1115G4 @3.00 GHz RAM 8 GB dengan sistem operasi Windows 11 64-bit. Adapun beberapa situs web dan perangkat lunak yang digunakan selama proses studi in silico ini antara lain :

1. PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk mengunduh struktur senyawa uji
2. SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) untuk memprediksi sifat fisikokimia
3. PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) untuk memprediksi Drug-Likeness, ADME, dan toksisitas
4. Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) untuk mengunduh protein target
5. Aplikasi LigandScout untuk melakukan pemodelan farmakofor
6. Aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2021 untuk preparasi ligan alami dan reseptor target serta untuk visualisasi hasil

- penambatan molekuler
7. Aplikasi Chemdraw 22.0.0 64-bit untuk menggambar struktur senyawa yang diujikan dan Chem3D 22.0.0 64-bit untuk meminimalkan energinya
 8. Aplikasi AutoDockTools-1.5.7 untuk melakukan analisis penambatan molekuler

2.2. Bahan

Protein target yaitu enzim Acetylcholinesterase (AChE) yang diperoleh dari Protein Data Bank dengan kode PDB ID 4EY7, ligan alami dan senyawa pembanding berupa Donepezil, serta senyawa uji yang berasal dari tanaman lada hitam (*P. nigrum* L.) yaitu piperin, piperidin, *chavicine*, *alpha-phellandrene*, *caryophyllene*, *ethoxyallene*, limonen, kuersetin, eugenol, dan kaempferol.

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

Untuk memprediksi sifat fisikokimia dari semua senyawa uji yang terkandung dalam suatu tanaman obat, kemudian menentukan senyawa uji yang memenuhi aturan *Lipinski's rules of five* sehingga diprediksi zat aktif tersebut dapat diberikan secara oral. Dilakukan dengan membuat struktur 2D nya terlebih dahulu menggunakan ChemDraw dan menyimpan dalam bentuk SMILES. Dilanjutkan dengan memprediksi sifat fisikokimia dengan menggunakan software <http://www.swissadme.ch/> dan mendata 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

Parameter yang dianalisis pada penentuan ADMET yaitu %HIA (*Human Intestinal Absorption*), Caco2 (*Cancer coli-2*), PPB (*Plasma Protein Binding*), BBB (*Blood-Brain Barrier Penetration*), serta hasil uji toksisitas dengan *Ames Test* dan dengan *Rodent Carcinogenicity*. Penentuan ini dilakukan pada laman <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/> dengan memilih fitur prediksi dari Pre-ADMET: *Drug-likeness Prediction*, *ADME Prediction*, dan *Toxicity Prediction*. Struktur digambar terlebih dahulu lalu melakukan

submit setelah selesai menggambar. Kemudian menyimpan hasil dengan format *file* yang diinginkan. Setelah itu, melakukan analisis terhadap hasil prediksi.

2.3.3. Preparasi Ligan dan Reseptor

Protein target dengan PDB ID: 4EY7 diunduh terlebih dahulu di Protein Data Bank pada laman www.rcsb.org dalam format .pdb. Kemudian, dilakukan pemisahan ligan alami dan reseptor target dengan membuka file .pdb dengan BIOVIA Discovery Studio 2021 yang diawali dengan melakukan anhidrase (menghilangkan molekul air). Ligan alami dan reseptor yang sudah terpisah disimpan dalam format .pdb. Ligan uji dipreparasi dengan menggambar strukturnya terlebih dahulu menggunakan aplikasi ChemDraw 22.0.0 64-bit dan disimpan dalam format .cdxml. Kemudian, file .cdxml dibuka menggunakan aplikasi Chem3D 22.0.0 64-bit untuk meminimalkan energi dan disimpan dalam format .pdb. Berikutnya, preparasi ligan uji dan ligan alami, serta reseptor dilakukan dengan menggunakan aplikasi AutoDockTools-1.5.7. Pada preparasi ligan uji dan ligan alami diberikan muatan Gasteiger, ditambahkan atom hidrogen, digabungkan senyawa menjadi non polar, dan dilakukan penginputan torsi. Kemudian, file disimpan dalam format .pdbqt. Sedangkan, pada preparasi reseptor diberikan muatan Kollman dan ditambahkan atom hidrogen polar. Kemudian, file disimpan dalam format .pdbqt.

2.3.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Simulasi penambatan molekuler diawali dengan melakukan validasi terlebih dahulu untuk menentukan posisi dan ukuran *grid box* yang akan digunakan. Validasi ini dilakukan dengan re-docking (menambatkan kembali) ligan alami pada reseptor menggunakan aplikasi AutoDockTools-1.5.7. Ukuran dan posisi *grid box* diatur sedemikian sehingga ketika dilakukan validasi penambatan molekuler nilai *Genetic Algorithm Lamarckian* sebesar 10. Pada penelitian ini, *grid box* yang digunakan bernilai sebagai berikut, *Grid Box* ($x = 40$; $y = 40$; $z = 40$), *Grid Coordinate* ($x = -13.988$; $y = -43.906$; $z = 27.108$) dengan

jarak 0.375 Å. Kemudian, file disimpan dalam format dock.gpf

Berikutnya dilakukan simulasi penambatan molekuler ligan uji pada reseptor yang telah dipreparasi sebelumnya. Tahap ini dilakukan menggunakan tahapan yang sama seperti pada tahap validasi tetapi menggunakan nilai *Genetic Algorithm Lamarckian* sebesar 100. Kemudian, file disimpan dalam format dock.dpf.

Hasil dianalisis menggunakan AutoDockTools-1.5.7 untuk melihat energi ikatan dan konstanta inhibisi. Kemudian, divisualisasi menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2021 untuk melihat interaksi ligan dengan reseptor dalam bentuk visualisasi 2D dan 3D.

2.3.5. Pemodelan Farmakofor

Proses memperbanyak senyawa aktif pada daftar hit dilakukan dengan membuat *Database Active/Decoy* dengan mengunduhnya terlebih dahulu di <https://dude.docking.org/targets>. Lalu file yang telah diunduh dibuka dengan ligandscout, semua tipe decoy dan active diubah menjadi training dan disimpan dengan format ldb, lalu laman dikosongkan. Kemudian setelahnya file yang telah diunduh dibuka dengan ligandscout, dan semua tipe senyawa uji diubah menjadi *Test* dan disimpan dengan format ldb, lalu laman dikosongkan. Selanjutnya file database active yang telah diminimisasi dibuka dan didapatkan 1 tipe training di setiap cluster, lalu dibuat farmakofor yang disimpan dalam bentuk pmz.

10 model farmakofor dipindahkan dengan fitur *copy to other perspective* ke *screening perspective* dan validasi dilakukan dengan menandai database active dengan warna hijau dan decoy dengan warna merah dan melihat serta memilih kurva ROC terbaik. Skrining farmakofor dengan memasukan database senyawa uji dan memberi tanda hijau pada database senyawa uji dan menghilangkan tanda warna pada database lain. Senyawa yang hit didapatkan setelah memindahkan model terbaik ke *Screening perspective* lalu *Perform Screening*.

3. Hasil

3.1. Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

Terdapat beberapa parameter yang digunakan dalam prediksi seperti berat molekul, nilai log P, serta ikatan hidrogen donor dan akseptor. Hasil pengujian yang didapatkan melalui prediksi *Lipinski's Rule of Five* terlampir pada Tabel 1. Dapat diinterpretasikan bahwa seluruh senyawa uji dari Buah Lada Hitam (*P. nigrum* L.) memenuhi syarat aturan *Lipinski's Rule of Five* sebagai kandidat senyawa obat.

3.2. Penentuan ADMET

Dalam penentuan ADMET, parameter nilai %HIA dan Caco-2 digunakan untuk melihat absorpsi senyawa uji, nilai %PPB dan BBB untuk melihat distribusi senyawa uji di dalam tubuh, sifat mutagen dan karsinogen untuk melihat toksisitas dari senyawa uji. Hasil pengujian yang didapat melalui penentuan ADMET pada situs online (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) yang terlampir pada Tabel 2. Berdasarkan parameter hasil pengujian, diketahui bahwa %PPB dan BBB yang paling tinggi ditunjukkan oleh senyawa *alpha-phellandrene*, *caryophyllene*, limonen, eugenol, dan kaempferol. Disamping itu, semua senyawa uji bersifat mutagen dan memiliki sifat karsinogen yang berbeda.

3.3. Preparasi Ligan dan Reseptor

Preparasi dilakukan terhadap reseptor yaitu enzim Acetylcholinesterase dengan PDB ID 4EY7 dan ligan alami Donepezil serta ligan uji dari Buah lada hitam. Protein target 4EY7 dapat dilihat pada Gambar 1. dimana didalamnya terdapat suatu ligan alami Donepezil (1-Benzyl-4-[(5,6-Dimethoxy1-Indanone-2-yl)methyl]Piperidine). Ligan alami Donepezil ditampilkan pada Gambar 2.

3.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Validasi metode dilakukan dalam tahapan penambatan molekuler dengan hasil seperti yang tertera pada Tabel 3. Berdasarkan hasil validasi, didapatkan *reference RMSD* dengan nilai ≤ 2 Å serta energi ikatan bernilai negatif. Simulasi penambatan

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

No	Nama Senyawa	Berat Molekul (< 500 Da)	Log P (<5)	Ikatan Hidrogen donor	Ikatan hidrogen akseptor	Keterangan
1.	Donepezil (senyawa pembanding)	379,49	4,3	0	4	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
2.	Piperin	285,34	3,5	0	3	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
3.	Piperidin	85,15	0,8	1	1	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
4.	Chavicine	285,34	3,5	0	3	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
5.	<i>alpha</i> -Phellandrene	136,23	3,2	0	0	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
6.	Caryophyllene	204,35	4,4	0	0	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
7.	Ethoxyallene	84,12	0,8	0	1	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
8.	Limonen	136,23	3,4	0	0	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
9.	Kuersetin	303,23	1,5	5	7	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
10.	Eugenol	164,20	2	1	2	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral
11.	Kaempferol	286,24	1,9	4	6	Memenuhi syarat untuk dijadikan sediaan oral

molekul dilakukan dengan ketentuan *grid box* yang sama seperti yang tercantum pada tabel.

Simulasi penambatan molekul dilakukan terhadap reseptor Asetilkolinesterase (AChE ; PDB ID : 4EY7), senyawa pembanding Donepezil, dan senyawa uji yang terkandung di dalam buah lada hitam (*P. nigrum* L.) yaitu piperin, piperidin, *chavicine*, *alpha*-*phellandrene*, *caryophyllene*, *ethoxyallene*, limonen, kuersetin, eugenol, dan kaempferol yang dapat dilihat pada Tabel 4. Terdapat interaksi antara senyawa uji dengan reseptor Asetilkolinesterase (AChE) yang terjadi pada residu asam amino PHE 295 melalui ikatan hidrogen. Hal ini serupa dengan interaksi yang dimiliki antara Donepezil sebagai ligan alami atau senyawa pembanding dengan reseptor Asetilkolinesterase (AChE). Tahapan selanjutnya, hasil simulasi penambatan molekul dan senyawa terbaik yang didapat akan divisualisasikan secara 2D dan 3D melalui aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020 yang dapat dilihat pada Tabel 5.

3.5. Pemodelan Farmakofor

Berdasar dari *data base*, didapatkan 10 model farmakofor yang diperkirakan mempunyai aktivitas terhadap reseptor dan memiliki *decoy* paling sedikit. Kemudian, dipilih salah satu model farmakofor terbaik dari 10 model farmakofor yang didapat tersebut. Senyawa yang hit didapatkan setelah memindahkan model terbaik ke *Screening perspective* lalu *Perform Screening*, yaitu kaempferol dan kuersetin dengan data yang tertera pada Tabel 6.

4. Pembahasan

In silico merupakan metode penelitian yang menggunakan teknologi komputer dan database untuk penelitian pengembangan obat. Pengembangan senyawa melalui studi *silico* merupakan informasi awal yang sangat bermanfaat sehingga pengembangan obat alzheimer tidak bersifat *trial and error*. Metode komputasi ini dapat menghemat biaya dan waktu karena dapat memprediksi struktur obat menggunakan persamaan matematika,

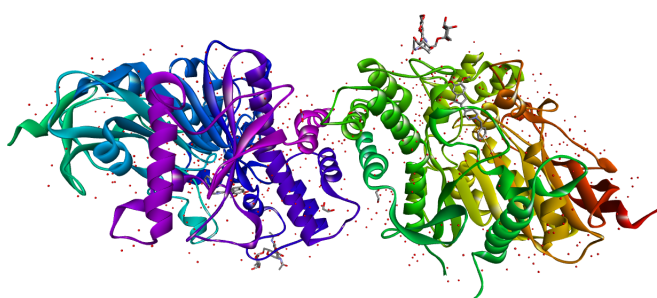
Tabel 2. Hasil penentuan ADMET

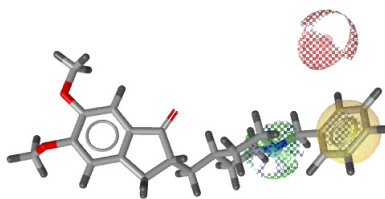
No	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksistas	
		HIA (%)	Caco-2 (nm/sec)	PPB	BBB	Mutagen	Karsinogen
1.	Donepezil (senyawa pembanding)	97,951	55,515	84,616	0,188	Mutagen	-
2.	Piperin	98,180	52,383	90,449	0,050	Mutagen	Mencit : - Tikus: +
3.	Piperidin	100	21,156	86,767	1,382	Mutagen	+
4.	Chavicine	98,180	52,383	90,449	0,050	Mutagen	Mencit : + Tikus: -
5.	alpha-Phellandrene	100	23,416	100	7,171	Mutagen	+
6.	Caryophyllene	100	23,632	100	13,319	Mutagen	Mencit: - Tikus: +
7.	Ethoxyallene	100	22,039	74,043	0,795	Mutagen	Mencit: + Tikus: -
8.	Limonen	100	23,632	100	8,278	Mutagen	Mencit : - Tikus: +
9.	Kuersetin	63,485	3,413	97,484	0,173	Mutagen	Mencit: - Tikus: +
10.	Eugenol	96,774	46,887	100	2,255	Mutagen	Positif
11.	Kaempferol	100	49,545	94,745	14,164	Mutagen	Mencit: Tikus: +

memvisualisasikannya dalam tiga dimensi dan mengevaluasi interaksi antara senyawa dan target sebelum mensintesis struktur ini menjadi obat. Studi *in silico* yang dilakukan adalah penambatan molekuler, prediksi sifat fisikokimia, dan prediksi toksistas. Potensi penghambatan dinilai berdasarkan nilai afinitas ikatan dan interaksi residu asam amino.¹⁶ Pada studi *in silico* ini, simulasi penambatan molekuler dilakukan terhadap senyawa-senyawa metabolit yang terkandung dalam Buah Lada Hitam (*P. nigrum* L.) dengan protein atau reseptor target berupa enzim Acetylcholinesterase dengan PDB ID 4EY7. Enzim ini merupakan salah satu enzim yang

paling efisien dan menjadi salah satu target potensial yang menyebabkan beberapa obat paliatif disetujui untuk pengobatan AD, reseptor dengan kode tersebut dipilih karena tidak bersifat mutagen dan di dalamnya terdapat suatu ligan alami Donepezil. Donepezil merupakan penghambat asetilkolinesterase yang disetujui untuk digunakan di seluruh spektrum penyakit alzheimer dengan derajat ringan, sedang, maupun berat.¹⁵

Aturan *Lipinski's Rule of Five* dilakukan untuk mengevaluasi keserupaan obat atau menentukan apakah suatu senyawa kimia dengan aktivitas farmakologis atau biologis

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



Gambar 2. Struktur Ligan Alami Donepezil

tertentu memiliki sifat kimia dan sifat fisik yang akan membuatnya menjadi obat aktif pada manusia (dijadikan sediaan oral), aturan dari RO5 menyatakan bahwa senyawa uji tidak boleh melebihi 500 Da, berat molekul ini berhubungan dengan kemampuan suatu senyawa untuk menembus membran, semakin besar berat molekul suatu senyawa maka semakin sulit pula ia untuk menembus membran, selain itu jumlah 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 semakin besar kapasitas ikatan hidrogen maka energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi semakin tinggi pula.¹⁷ Dimana seluruh senyawa pada buah lada hitam, yaitu piperin, piperidin, chavicine, alpha-phellandrene, caryophyllene, ethoxyallene, limonen, kuersetin, eugenol, dan kaempferol memenuhi keempat syarat lipinski yang telah disebutkan memberi arti bahwa senyawa-senyawa yang nantinya akan digunakan mempunyai kemampuan untuk dijadikan sediaan oral.

Prediksi farmakologi senyawa dievaluasi melalui absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas

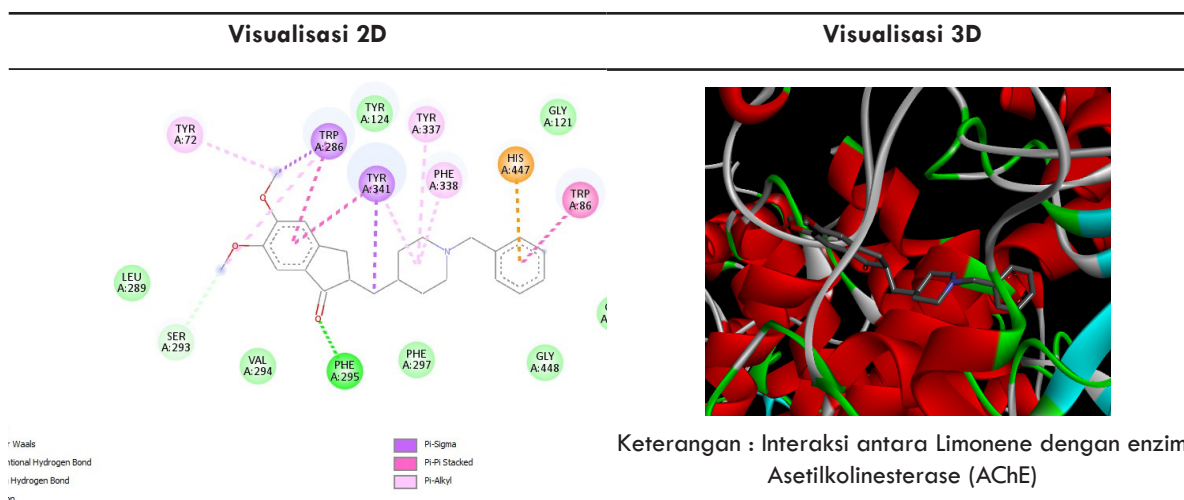
(ADMET). Untuk memprediksi sebaik apa absorpsi obat dalam usus dapat dilihat dari nilai HIA (*Human Intestinal Absorption*) dan Caco2, dimana nilai HIA ini merupakan hasil dari penjumlahan bioavailabilitas dengan absorpsi yang dievaluasi dari hasil rasio ekskresi melalui urine, empedu, dan feses.¹⁸ Kemudian Sel Caco2 merupakan parameter kemampuan permeabilitas yang digunakan untuk mengetahui perpindahan obat melalui sel epitel di usus yang berasal dari adenocarcinoma usus besar manusia dengan jalur transportasi ganda dengan model secara *in vitro*.¹⁸ Interpretasi nilai persentase HIA, 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.¹⁹ Dari sepuluh senyawa yang diuji, didapatkan 1 senyawa yang memiliki daya absorpsi sedang, dan 9 senyawa lainnya memiliki daya absorpsi yang baik. 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.¹⁹ Dari

Tabel 3. Hasil validasi penambatan molekuler

Ligan Alami	Binding Energy (KKal/mol)	Reference RMSD	KI (nM)	Ukuran Grid Box	Koordinat Grid Box	Asam Amino
Donepezil	-11,02	0,68	6,16 nM	40 x 40 x 40	x = -13,988 y = -43,906 z = 27,108	Ikatan Hidrogen : PHE295, SER293, ARG296 Ikatan Van der Waals : VAL294, PHE297, TYR124, GLY121, SER203, GLU202, GLY448, Lain-lain : LEU289, TRP286, TYR341, PHE338, HIS447, TRP86

Tabel 4. Hasil penambatan molekuler

No	Senyawa	Cluster	Binding Energy (kkal/mol)	Ki (nM)	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Lain-lain
1.	Donepezil (senyawa pembeding)	97	-11,02	6,16 nM	PHE295, SER293, ARG296	VAL294, PHE297, TYR124, GLY121, SER203, GLU202, GLY448	LEU289, TRP286, TYR341, PHE338, HIS447, TRP86
2.	Piperin	96	-11,05	6,17 nM	PHE295, SER293	GLU202, SER203, GLY121, TYR124, LEU289, VAL294, PHE297, GLY448	TRP286, PHE338, TYR341, TYR337, TYR72, TRP286, HIS447
3.	Piperidin	92	-11,06	5,92 nM	PHE295, SER293	TYR124, GLY448, LU202, SER203, GLY121, PHE297, VAL294	HIS447, TRP86, TYR337, TYR72, TYR341, TRP286, PHE338
4.	Chavicine	96	-11,01	6,17 nM	PHE295, SER293	GLY121, SER203, GLU202, GLY448, TYR124, LEU289, VAL294, PHE297	TRP86, HIS447, TYR337, TYR341, TYR72, TRP286, PHE338
5.	Alpha-phellandrene	100	-11,03	6,19 nM	PHE295, SER293	GLY121, SER203, GLU202, GLY448, TYR124, VAL294, PHE297	TRP86, HIS447, TYR337, TYR341, TYR72, TRP286, PHE338
6.	Caryophyllene	96	-11,02	6,16 nM	PHE295, SER293	GLU202, SER203, GLY121, PHE297, VAL294, LEU289, TYR124, GLY448	HIS447, TYR337, TYR341, TYR72, TRP286
7.	Ethoxyallene	96	-11,06	5,58 nM	PHE295, SER293	TYR124, VAL294, PHE297, GLY121, SER203, ILE451, GLU202, GLY448	TYR72, TRP286, TYR341, TYR337, PHE338, HIS447, TRP86
8.	Limonen	95	-11,07	5,40 nM	PHE295, SER293	TYR124, LEU289, VAL294, PHE297, GLY448, GLU202, SER203, GLY121	TYR72, TRP286, TYR341, TYR337, TYR124, PHE338, HIS447
9.	Kuersetin	95	-11,05	6,16 nM	PHE295, SER293	GLU202, SER203, GLY121, PHE297, VAL294, TYR124, GLY448	TRP86, PHE338, TRP286, TYR72, TYR341, TYR337, HIS447
10.	Eugenol	97	-11,10	6,19 nM	PHE295, SER293	GLY121, SER203, GLU202, GLY448, TYR124, LEU289, VAL294, PHE297	TRP86, HIS447, PHE338, TYR337, TYR341, TYR72, TRP286
11.	Kaempferol	99	-11,02	6,20 nM	PHE295, SER293	GLU202, SER203, GLY121, PHE297, LEU289, VAL294, TYR124, GLY448	TRP86, PHE338, TRP286, TYR342, TYR72, TYR337, HIS447

Tabel 5. Hasil visualisasi penambatan molekuler pada limonen

sepuluh senyawa yang diuji, didapatkan 1 senyawa yang menunjukkan permeabilitas senyawa rendah, dan 9 senyawa lainnya menunjukkan permeabilitas senyawa sedang. Dari hasil prediksi yang didapatkan, senyawa obat uji memiliki daya serap yang baik dan permeabilitas sedang meskipun terdapat 1 senyawa obat uji yang memiliki daya serap sedang dan permeabilitas yang rendah yaitu kuersetin.

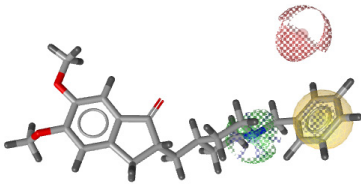
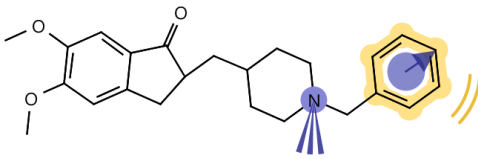
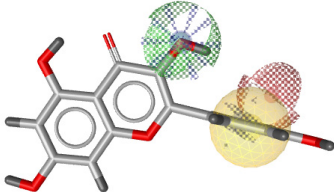
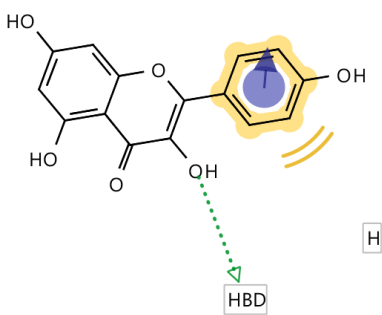
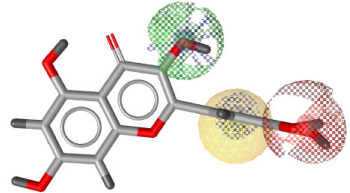
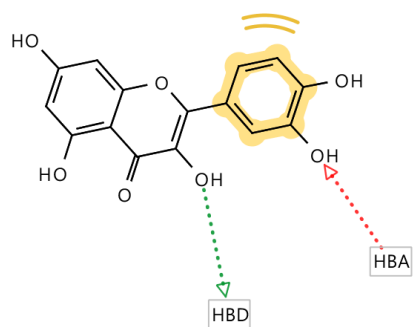
Selanjutnya untuk prediksi distribusi obat terdiri atas parameter PPB (*Plasma Protein Binding*) dan BBB (*Blood Brain Barrier*). PPB menggambarkan seberapa kuat molekul berikatan dengan protein plasma sedangkan BBB menggambarkan prediksi kemampuan senyawa untuk menembus sawar darah otak.²⁰⁻²¹ Nilai PPB <90% menunjukkan ikatan yang lemah dan nilai PPB sebesar > 90% menunjukkan ikatan yang kuat.²² Dari hasil prediksi yang didapatkan, 2 senyawa memiliki ikatan yang lemah sedangkan 8 senyawa lainnya memiliki ikatan yang kuat. 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.²³ Dari hasil prediksi yang didapatkan, 4 senyawa memiliki daya penetrasi SSP yang rendah, 1 senyawa memiliki daya penetrasi SPP yang sedang sedangkan 5 senyawa lainnya memiliki daya penetrasi yang tinggi.

Pharmacophore Screening diawali

dengan pemodelan farmakofor, dengan tujuan untuk memperoleh senyawa-senyawa bahan alam yang memiliki gugus farmakofor penting dalam aktivitas farmakologi. Model farmakofor ini divalidasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa model tersebut dapat membedakan antara senyawa yang aktif dan tidak aktif. Farmakofor merupakan suatu bagian dari struktur senyawa obat yang diperlukan untuk memastikan interaksi optimal dengan target biologis tertentu dan untuk memicu (atau memblokir) respon biologisnya. Dari hasil pemodelan farmakofor didapatkan ikatan hidrofobik, aromatik, ikatan hidrogen (akseptor dan donor), negative ionizable, dan positive ionizable.²⁴⁻²⁵ Dengan diduplikasinya data senyawa hit setelah dari skrining farmakofor, yaitu kaempferol dan kuersetin, yang menunjukkan kedua senyawa tersebut memiliki decoy sesedikit mungkin.

Penambatan molekuler adalah suatu teknik yang digunakan untuk memodelkan interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul. Penambatan molekuler dapat memprediksi orientasi dari suatu molekul ketika berikatan sehingga membentuk kompleks yang stabil. Teknik penambatan molekuler memungkinkan kita untuk mengevaluasi kecocokan obat potensial (ligan) ke situs reseptor. Secara umum, penambatan molekuler adalah penggunaan komputerisasi dalam memasang suatu molekul kecil pada reseptor (bagian ini sering didefinisikan sebagai sisi aktif dari enzim) melalui

Tabel 4. Hasil penambatan molekuler

3D	2D
Donepezil	
	
Pharmacophore Fit Score: 35,85	
Kaempferol	
	
Pharmacophore Fit Score: 34,37	
Kuersetin	
	
Pharmacophore Fit Score: 31,03	

representasi yang dihasilkan komputerisasi. Hasil dari docking secara umum meliputi prediksi afinitas molekul, termasuk ranking dari senyawa yang di-docking berdasarkan pada afinitasnya. Metode pendekatan ini akan memberikan kemungkinan interaksi dalam berbagai konformasi ligan sehingga memungkinkan untuk mendapatkan hasil yang terbaik. Jumlah bentuk konformasi yang memungkinkan sesuai dengan banyaknya ikatan rotatable yang ada. Tahapan prosedur docking terdiri dari tiga langkah, yaitu preparasi ligan, preparasi protein dan simulasi docking.²⁶

Pada tahap preparasi ligan dan

reseptor, Protein target dengan PDB ID: 4EY7 diunduh terlebih dahulu di *Protein Data Bank* kemudian dilakukan pemisahan ligan alami dan reseptor target yang diawali dengan melakukan anhidrase (menghilangkan molekul air), hal ini dimaksudkan agar ligan dapat berinteraksi maksimal dengan reseptor karena dikhawatirkan ligan air terikat dengan sisi aktif reseptor yang menyebabkan ligan lain terhalangi untuk berikatan. Selanjutnya ligan uji dipreparasi dengan menggambar strukturnya terlebih dahulu lalu diminimalkan energinya, berikutnya ligan uji dan ligan alami diberikan muatan Gasteiger, ditambahkan atom hidrogen, digabungkan senyawa

menjadi non polar, dan dilakukan penginputan torsi. Sedangkan, pada preparasi reseptor diberikan muatan Kollman dan ditambahkan atom hidrogen polar.

Simulasi penambatan molekuler diawali dengan melakukan validasi terlebih dahulu untuk menentukan posisi dan ukuran *grid box* yang akan digunakan. Validasi ini dilakukan dengan *re-docking* (menambatkan kembali) ligan alami pada reseptor. Ukuran dan posisi *grid box* diatur sedemikian sehingga ketika dilakukan validasi penambatan molekul nilai Genetic Algorithm Lamarckian sebesar 10. Pada penelitian ini, *grid box* yang digunakan bernilai sebagai berikut, *Grid Box* ($x = 40$; $y = 40$; $z = 40$), *Grid Coordinate* ($x = -13,988$; $y = -43,906$; $z = 27,108$) dengan jarak $0,375 \text{ \AA}$. Berikutnya dilakukan simulasi penambatan molekuler ligan uji pada reseptor yang telah dipreparasi sebelumnya. Tahap ini dilakukan menggunakan tahapan yang sama seperti pada tahap validasi tetapi menggunakan nilai Genetic Algorithm Lamarckian sebesar 100. Hasil dianalisis untuk melihat energi ikatan dan konstanta inhibisi. Kemudian, divisualisasi menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2021 untuk melihat interaksi ligan dengan reseptor dalam bentuk visualisasi 2D dan 3D yang terdapat pada Tabel 5. Parameter daripada penambatan molekul adalah ikatan hidrogen, nilai energi bebas ikatan (ΔG), nilai konstanta inhibisi (K_i) serta residu asam amino yang bersesuaian dengan ligan alami atau ligan pembanding. Parameter-parameter ini berpengaruh kepada afinitas (kemampuan ligan untuk berikatan dengan reseptor).

Energi bebas ikatan (ΔG) menggambarkan perubahan energi bebas dalam suatu sistem selama suatu reaksi atau interaksi. Dalam konteks pengikatan ligan dengan makromolekul atau protein, nilai ΔG negatif menunjukkan bahwa interaksi tersebut cenderung terjadi secara spontan dan menghasilkan kompleks ligan-protein yang stabil.²⁷ Sedangkan, nilai konstanta inhibisi (K_i) memberikan informasi tentang seberapa efektif suatu ligan atau senyawa dalam menghambat aktivitas suatu makromolekul atau protein. Konstanta inhibisi adalah ukuran

afinitas antara ligan dan makromolekul yang diinhibisi. Semakin kecil nilai (K_i), semakin rendah konsentrasi ligan yang diperlukan untuk mencapai penghambatan yang signifikan. Artinya, semakin rendah nilai (K_i), semakin kuat afinitas ligan terhadap makromolekul tersebut dan semakin efektif ligan dalam menghambat aktivitasnya. Nilai (K_i) yang lebih kecil karena berarti ligan tersebut dapat menghambat makromolekul dengan konsentrasi yang lebih rendah. Hal ini bisa menjadi indikator potensi ligan sebagai obat atau agen terapeutik yang efektif, karena konsentrasi yang lebih rendah dapat mengurangi kemungkinan efek samping atau toksisitas yang tidak diinginkan.²⁸

Dari hasil penambatan molekuler pada Tabel 4, dapat dilihat senyawa dengan K_i terendah, yaitu limonen dengan nilai sebesar $-11,07$ dan K_i $5.40 \text{ }\mu\text{M}$. Interaksi yang diperoleh sama antara penambatan ligan alami (donepezil) dengan asetilkolinesterase dan senyawa limonene dengan asetilkolinesterase adalah interaksi hidrogen dengan residu Phe A:295, selain interaksi hidrogen ada pula interaksi hidrogen karbon pada Ser A:293 dan ikatan lainnya pada rantai A (TRP 86, HIS 447, TYR 337, TYR 341, TRP 286). Dengan 7 kesamaan pada 10 interaksi yang didapat, diketahui terdapat 70% kesamaan ikatan. Interaksi yang sama antara senyawa dan pembanding pada penambatan molekuler dapat menunjukkan kemiripan atau kesamaan dalam interaksi yang terbentuk antara senyawa tersebut dengan reseptor atau target molekuler yang sama. Ini dapat memberikan indikasi bahwa senyawa tersebut memiliki potensi untuk berinteraksi dengan target yang sama dengan cara yang serupa.²⁹ Oleh karena itu, senyawa atau ligan uji yang paling baik diantara ke 10 ligan uji yang dianalisis menggunakan penambatan molekuler, prediksi Lipinski, dan ADMET dengan hasil paling baik diperoleh dari senyawa Limonen.

Pada prediksi ADMET, senyawa limonen juga menunjukkan nilai %HIA yang baik yaitu sebesar 100% dan nilai permeabilitas Caco-2 yang termasuk ke dalam kategori sedang dengan nilai $23,63 \text{ nm/sec}$. Pada uji distribusi, %PPB dan %BBB menunjukkan nilai yang

sangat baik dimana PPB menunjukkan hasil sebesar 100% dan %BBB sebesar 8,28% hal ini menunjukkan obat memiliki kemampuan distribusi yang baik akibat kuatnya ikatan protein plasma juga penetrasi obat ke sawar otak sangat baik. Selain parameter di atas, seluruh profil fisikokimia dan hasil penambatan molekuler senyawa limonen memberikan hasil yang sesuai. Sehingga diketahui senyawa piperin memiliki potensi yang paling baik sebagai kandidat obat untuk mengobati Alzheimer melalui inhibisi enzim Acetylcholinesterase.

5. Simpulan

Telah dilakukan studi *in silico* menggunakan metode *Lipinski's Rule of Five*, penentuan ADMET, preparasi struktur, dan penambatan molekuler, diketahui senyawa limonene yang terkandung pada buah lada hitam (*P. nigrum* L.) memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor enzim Acetylcholinesterase (AChE) dengan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi terbaik, yaitu berturut-turut sebesar -11,07 kkal/mol dan 5,40 nM, dan telah dibandingkan dengan kontrol positif, didapat ikatan hidrogen yang sama terjadi pada residu asam amino PHE 295 dan SER293; ikatan van der Waals pada residu asam amino TYR124, VAL294, PHE297, GLY448, GLU202, SER203, dan GLY121; serta ikatan lainnya pada residu asam amino TRP286, TYR341, PHE338, dan HIS447.

Daftar Pustaka

- Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*. 2016;12(4):459–509.
- Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*. 2016;14(1):101–115.
- World Health Organization. Dementia [diunduh 21 Mei 2023]. Tersedia dari : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Aji SP, Anantanyu S. Alzheimer Dan Gejala Sistem Saraf (Neurologis) Akibat Pestisida: Alzheimer's and the Symptoms of the Nervous System (Neurological) Due to Pesticides. *Public Health and Safety International Journal*. 2022;2(1):99-102.
- Alamri KN, Posangi J, Nangoy E. Perbandingan Efektivitas Penggunaan Donepezil dan Memantine Terhadap Perbaikan Fungsi Kognitif pada Penyakit Alzheimer. *Jurnal Biomedik: JBM*. 2021;13(2):218-226.
- Thakur AK, Kamboj P, Goswami K, Ahuja KJ. Pathophysiology and management of Alzheimer's disease: An overview. *J. Anal. Pharm. Res*. 2018;7(1):226-236.
- Sianturi AG. Stadium, Diagnosis, dan Tatalaksana Penyakit Alzheimer. *Majalah Kesehatan Indonesia*. 2021;2(2):39-44.
- Santos TC, Gomes TM, Pinto BA, Camara AL, Paes AM. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1192.
- Okello EJ, Mather J. Comparative kinetics of acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibition by green tea catechins | relevance to the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Nutrients*. 2020;12(4):1090.
- Hikmawanti NP, Hanani E, Maharani S, Putri AI. Kadar Piperin Ekstrak Buah Cabe Jawa dan Lada Hitam dari Daerah dengan Ketinggian Berbeda. *J Jamu Indonesia*. 2021;6(1):16-22.
- Rashedinia M, Mojarad M, Khodaei F, Sahragard A, Khoshnoud MJ, Zarshenas MM. The Effect of a Traditional Preparation Containing *Piper nigrum* L. and *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. on Immobility Stress-Induced Memory Loss in Mice. *BioMed research international*. 2021;2021:1-8.
- Arsana IN, Juliasih NK, Ayu Sauca Sunia Widyantari AA, Suriani NL, Manto A. GC-MS Analysis of the Active Compound in Ethanol Extracts of White Pepper (*Piper nigrum* L.) and Pharmacological Effects. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*. 2022;2(3):151-61.
- Anggraini R, Jayuska A, Alimuddin

- AH. Isolasi dan karakterisasi minyak atsiri lada hitam (*Piper nigrum* L.) asal saingan kalimantan barat. Jurnal Kimia Khatulistiwa. 2018;7(4):124-153.
14. Wojtunik-Kulesza K, Rudkowska M, Kasprzak-Drozd K, Oniszcuk A, Borowicz-Reutt K. Activity of Selected Group of Monoterpenes in Alzheimer's Disease Symptoms in Experimental Model Studies—A Non-Systematic Review. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(14):7366.
 15. Lee JH, Jeong SK, Kim BC, Park KW, Dash A. Donepezil across the spectrum of Alzheimer's disease: dose optimization and clinical relevance. Acta Neurologica Scandinavica. 2015;131(5):259-67.
 16. Naufa JH, Mutiah R, Indrawijaya YYA. Studi in Silico Potensi Senyawa Katekin Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sebagai Antivirus SARS CoV-2 terhadap Spike Glycoprotein (6LZG) dan Main Protease (5R7Y). Journal of Food and Pharmaceutical Science. 2021;10(1):584-596.
 17. Roskoski R Jr. Rule of five violations among the FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. Pharmacological Research. 2023; 191(2023): 106774.
 18. Nursamsiar N, 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.
 19. 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.
 20. Kumar R, Giri A, Nadendla RR. In Silico ADME Profiling of CDK9 Inhibitors. Journal of Scientific Research in Pharmacy. 2018;7(3):30-4.
 21. Purwaniati. Studi Docking Molekul Aktivitas Obat COVID-19 dari Derivat N-(2-phenylethyl)methanesulfonamide sebagai Inhibitor Main Protease. AdDawaa' J. Pharm. Sci. 2020;3(1):1–11.
 22. Prasetyawati R, Suherman M, Permana B, Rahmawati R. Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. IJPST. 2021;8(1): 8-20.
 23. Suherman M, Prasetyawati 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.
 24. Riyaldi MR, Fatiya NU, Dipadharma R HF, Kusnadi IF, Hidayat S, Suhandi C, Muchtaridi M. Studi In-Silico Senyawa Pada Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Sebagai Inhibitor Neuraminidase Pada Influenza. Farmaka. 2022;20(3):1-11.
 25. Sangande F, Unepetty JP. Identifikasi Senyawa Bahan Alam Sebagai Inhibitor Tirosin Kinase EGFR: Skrining In Silico Berbasis Farmakofor dan Molecular Docking. Jurnal Fitofarmaka Indonesia. 2021;8(1):1-6.
 26. Nugraha R. Studi Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas, Searching Farmakofor, Virtual Screening, Docking Molekul, Uji Toksisitas dan Profil Farmakokinetik Senyawa Turunan Capsaicin Sebagai Antagonis Reseptor Trpv1 Secara In Silico. Makassar: UIN Alauddin Makassar; 2018.
 27. Purnomo H. Kimia Komputasi Uji In Silico Senyawa Anti Kanker. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2013.
 28. Ruswanto R, Ratnasari A, dan Tuslinah L. Sintesis senyawa N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide dan studi interaksinya pada mycobacterium tuberculosis enoyl acyl carrier protein reductase (INHA). Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada. 2015;14(1):63-73.
 29. Bernaldez MJA, Billones JB, Magpantay A. In silico analysis of binding interactions between GSK983 and human DHODH through docking and molecular dynamics. AIP Conference Proceedings. 2018 ;2045(1):1-8.