



Molecular Docking of Red Betel Leaf Bioactive Compounds (*Piper crocatum*) as Lipoxxygenase Inhibitor

Fernanda Chairunisa^{1*}, Mega Safithri¹, Dimas Andrianto¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bogor Agricultural University, Bogor 16680, West Java Indonesia.

Submitted 03 June 2022; Revised 10 June 2022; Accepted 27 July 2022; Published 30 June 2023

*Corresponding author: fernandachairunisa@apps.ipb.ac.id

Abstract

Degenerative diseases occurred due to several risk factors that are directly related to inflammation which affected several diseases such as coronary heart disease (CHD) and diabetes. One of the inflammatory causative agents is leukotrienes produced by the lipoxxygenase enzyme (LOX) so that it takes anti-inflammatory drugs made from herbal plants. Red betel leaf (*Piper crocatum*) potentially inhibited the lipoxxygenase enzyme because it contains potential phytochemical compounds such as alkaloids, flavonoids, eugenol, saponins, and tannins. This research aimed to test the inhibition of active compounds from extract and fractions of red betel leaves that have the best inhibition for lipoxxygenase enzymes causing malondialdehyde formed through molecular docking simulations. This research used lipoxxygenase enzyme as receptor (PRB code: 4NRE), C8E as natural ligand and active compound from extract and fractions of red betel leaves as a ligand. The highest inhibition regarded to Nandrolone phenylpropionate and Sofalcone ligand with -10.4 kcal/mol and -9.1 kcal/mol of affinity energy. Amino acid residues that played a role in ligand and receptor interaction were HIS373 and HIS378. The receptor structure with the best ligands was declared stable based on molecular dynamics simulations.

Keywords: Inflammation, Lipoxxygenase, Molekular docking, Red betel leaf

Penambatan Molekuler Senyawa Bioaktif Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Inhibitor Lipoksigenase

Abstrak

Penyakit degeneratif terjadi karena beberapa faktor risiko yang berhubungan langsung dengan peradangan yang mempengaruhi beberapa penyakit seperti penyakit jantung koroner (PJK) dan diabetes. Salah satu agen penyebab inflamasi adalah leukotrien yang diproduksi oleh enzim lipoksigenase (LOX) sehingga dibutuhkan obat antiinflamasi yang terbuat dari tanaman herbal. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) berpotensi menghambat enzim lipoksigenase karena mengandung senyawa fitokimia potensial seperti alkaloid, flavonoid, eugenol, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan menguji penghambatan senyawa aktif dari ekstrak dan fraksi daun sirih merah yang memiliki penghambatan terbaik untuk enzim lipoksigenase yang menyebabkan terbentuknya malondialdehid melalui simulasi penambatan molekuler. Penelitian ini menggunakan enzim *lipoxxygenase* sebagai reseptor (kode PRB: 4NRE), ligan alami C8E, dan senyawa aktif dari ekstrak dan fraksi daun sirih merah sebagai ligan. Penghambatan tertinggi dimiliki oleh *Nandrolone phenylpropionate* dan *Sofalcone* dengan energi bebas pengikatan sebesar -10,4 kkal/mol dan -9.1 kkal/mol. Residu asam amino yang berperan dalam interaksi ligan dan reseptor adalah HIS373 dan HIS378. Struktur reseptor dengan ligan terbaik dinyatakan stabil berdasarkan simulasi dinamika molekul.

Kata Kunci: Daun sirih merah, Inflamasi, Lipoksigenase, Penambatan molekuler

1. Pendahuluan

Penyakit degeneratif atau penyakit tidak menular menjadi permasalahan kesehatan terdepan yang belum terkendali saat ini yang menyebabkan kematian tertinggi di dunia sebesar 71%¹. Penyakit degeneratif terjadi akibat beberapa faktor resiko yang berkaitan langsung dengan inflamasi salah satunya pola hidup yang tidak baik. Inflamasi ini terjadi akibat dari reaksi oksidasi berlebih yang menghasilkan senyawa radikal bebas dan apabila keadaanya berlebihan dalam tubuh akan menyebabkan *stress* oksidatif yang berkorelasi kuat dengan kemunculannya inflamasi². Penyakit degeneratif yang berkaitan dengan inflamasi seperti penyakit jantung koroner (PJK) dan diabetes¹. Kematian akibat PJK di dunia pada tahun 2019 dilaporkan terjadi pada 17.9 juta jiwa dengan kriteria yakni usia kurang dari sama dengan 70 tahun dan 1.5 juta jiwa kematian disebabkan akibat penyakit diabetes. Indonesia memiliki total prevalensi PJK dan stroke sebesar 13.6% dan menjadi Negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak di dunia yakni pada posisi ke-4 yaitu sebesar 8,4 juta jiwa^{3,4}.

Pengobatan untuk penyakit yang berkaitan dengan inflamasi umumnya merupakan obat-obatan kimiawi, salah satunya obat anti inflamasi komersil yakni obat anti inflamasi non steroid (NSAID). Disamping pemakaiannya yang sering digunakan, NSAID menjadi obat yang harus dihindari oleh penderita diabetes dan PJK. Penderita diabetes yang mengkonsumsi NSAID dapat mengalami gagal ginjal akut akibat perubahan hemodinamik ginjal dan memiliki resiko peningkatan tekanan darah yang menjadikan diabetes sebagai faktor resiko primer untuk PJK. Selain itu, konsumsi NSAID dalam jangka panjang pada penderita PJK beresiko terjadinya stroke⁵. Oleh karena itu, obat-obatan berbahan dasar alami menjadi harapan baru sebagai obat antiinflamasi dengan efek samping yang sedikit. Salah satu agen penyebab inflamasi yaitu leukotrien yang dihasilkan oleh enzim lipoksigenase (LOX). Hal tersebut menjadikan LOX sebagai target obat untuk terapi berbagai penyakit yang berkaitan dengan inflamasi menggunakan

bahan dasar alami seperti senyawa turunan kumarin dan tanaman *Cuminum cyminum*^{6,7}.

Tanaman herbal telah banyak diteliti terkait kandungan antioksidan yang dapat berpotensi sebagai agen antiinflamasi. Salah satu tanaman herbal yang berpotensi untuk menjadi obat antiinflamasi yaitu daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang mengandung senyawa fitokimia yang baik untuk manusia seperti alkaloid, flavonoid, kavakol, eugenol, saponin, dan tannin⁸. Penelitian mengenai potensi daun sirih merah sebagai antiinflamasi telah dilakukan dengan ekstrak etanol 90% daun sirih merah sebagai peningkat kadar SOD dan penurunan kadar MDA pada jaringan paru-paru mencit akibat *stress* oksidatif dengan pemberian ekstrak dosis optimal di 230.4 mg/g⁹. Penelitian secara komputasi juga telah berhasil dilakukan menggunakan komponen daun bahan dasar alam yang mengandung flavonoid, alkaloid, dan fenol untuk menghambat sebagai inhibitor enzim lipoksigenase^{10,11} namun penggunaan daun sirih merah sebagai inhibitor enzim lipoksigenase belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, pengembangan antiinflamasi berbasis daun sirih merah diperlukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan senyawa aktif ekstrak dan fraksi daun sirih merah yang berpotensi untuk menghambat enzim lipoksigenase penyebab terbentuknya malondialdehid melalui simulasi penambatan molekuler. Penelitian ini bermanfaat sebagai acuan peneliti lainnya yang ingin melakukan penelitian terkait serta sebagai pembaruan untuk penemuan obat penghambatan pembentukan malondialdehid.

2. Metode

2.1. Alat

Peralatan yang digunakan berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras tersebut berupa laptop dengan spesifikasi Acer Swift 3, *Processor* AMD Ryzen 5 4500U with Radeon Graphics, sistem operasi *windows* 10 dan perangkat lunak (*software*) *MarvinView*, *Discovery Studio Visualizer*, *Autodock Tools Vina* (The *Scripps Research Institute*, USA), *CMD*, *Ligplot+*, *PyMOL* dan *YASARA-Structure*.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah file ligan 3D dari tanaman daun sirih merah dalam format *.sdf, yang diambil dari PDB serta reseptor yang digunakan yaitu struktur kristal ALOX 15 (4NRE) dengan format fasta, PDB, PDBQT, struktur kimia enzim ALOX 15, struktur kimia senyawa aktif fraksi n-heksan dan etil asetat berdasarkan hasil LCMS sebanyak 61 ligan uji ^{12,13,14,15,16,17,18,19,20}.

2.3. Prosedur

2.3.1. Preparasi Struktur Reseptor

Reseptor yang digunakan pada penelitian kali ini adalah LOX-15 kode 4NRE yang diperoleh dari laman <https://www.rcsb.org/> dengan format *.pdb. Preparasi reseptor menggunakan *Discovery Studio* dan *Autodock vina*. Preparasi dilakukan dengan menghilangkan molekul air dan ligan yang sudah ada pada reseptor, ditambahkan atom hidrogen dan disimpan dalam format *.pdbqt.

Tabel 1. Bahan Ligan ekstrak dan fraksi daun sirih merah

Ekstrak etanol	Ekstrak n-heksana	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Beta -amyrin	Butil etanoat	L-(+)-Arginin hidroklorida	MLS000557666	(3R,4R,5R)-3,4-Bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)-methyl)dihydrofuran-2(3H)-one
Spathulenol	Alfa pinen	1-(1,4-Ditian-2-ylmetil)-3-(3-metoksi propil) tiourea	6-Amino-4-[3-benzyloxy) phenyl]-3-tert-butyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	[(1S,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-Diacetyloxy-9,15-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyclo [11.3.1.03,10.04,7] heptadec-13-en-1-yl] benzoate
Humulene	Limonen	Metil eugenol	6XO32ZSPID	CHEMBL2398181
Beta-Caryophyllene	Cineol-1,8	4-Metoksi indole	Columbin	CHEMBL518595
Kaempferitrin	Terpinen-4-ol	Leusilleusin amida hidroklorida (1:1)	Isocaviunin 7-O-gentiobioside	5-[Bis(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyl) methyl]-2-methoxybenzyl acetate
Rutin		Ni-(5-methylisoxazole-3-yl) ethanediamide	Ethyl L-serinate hydrochloride	Methyl 2-[14-acetyloxy-6-(furan-3-yl)-1,5,15,15-tetramethyl-8,17-dioxo-7-oxatetracyclo
Germacrene D		Asam protokatekuat	CHEMBL216163	Guanidine Tartrate
Nandrolone		CHEMBL3217136	Flemiphilippin A	Methyl 3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-3-(4-(octyloxy) phenyl) propanoate
Phenylpropionat				Isobenzofuran-4,7-dione
Neophytadiene		1H-pyrazole-1-carboximidamidmidhydrochloride	Schisandrin B	
Beta-Bisabolene		2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol	Asam asetat	Lankacidin C
Asam Propionat		SCHEMBL569003	CHEMBL2398181	Ingenol-3-Benzoate
Sulfamethoxazole				Euphorbiasteroid
Beta-ocimene				N-(Decanoyl) piperidine
Anthocyanin				Phthalic anhydride
Thiamine nitrat				Methyl 6-hidroxyangolensate
Beta-mycrene				Sofalcone
Elemicin				Urapidil
Phytol				

2.3.2. Preparasi Struktur Ligan

Ligan yang digunakan pada penelitian terdiri dari dua jenis ligan, yaitu ligan alami dan ligan uji dari daun sirih merah. Ligan diunduh di situs *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan bentuk 3D yang disimpan dengan format *.sdf. Ligan yang telah diunduh kemudian diubah menjadi *.pdb menggunakan *Marvin View* 6.0.0. Ligan yang digunakan merupakan komponen yang didapatkan dari hasil penelitian terdahulu yang merupakan hasil analisis LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) dengan sensitivitas dan spesifisitas yang dapat digunakan untuk penelitian berbasis komputasi^{12,13,14,15,16,17,18,19,20}.

2.3.3. Prediksi Toksisitas dan Analisis Stabilitas Ligan Senyawa Bioaktif Daun Sirih

Prediksi toksisitas dilakukan pada ligan uji daun sirih merah yang diunduh pada laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam bentuk format SMILES. Prediksi dilakukan dengan mengunggah ligan yang telah dipilih pada laman <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetstar1/predict/> yang merupakan perangkat lunak admetstar 1.0. Hasil analisis berupa inhibisi herG, karsinogenisitas, dan toksisitas oral akut. Analisis stabilitas ligan dilakukan pada laman <http://www.swissadme.ch> untuk prediksi stabilitasnya <http://scfbio-iiitd.res.in/>.

2.3.4. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi dilakukan dengan menambat ulang protein 4NRE dengan ligan alaminya sebagai acuan penentuan grid box berupa sisi aktif enzim untuk berikatan dengan ligan uji coba. Validasi metode dilakukan dengan penentuan daerah penambatan (*grid box*) menggunakan *AutoDockTools* 1.5.6. Dimensi *grid box* dilakukan pada daerah pusat pusat $x=11.646$, $y=-57.414$, $z=-23.690$ dan dimensi $x=28$, $y=20$, dan $z=30$. Validasi penambatan molekuler dilakukan sebanyak 20 kali hingga mendapatkan nilai *Root Mean Standard Deviation* (RMSD) kurang dari 2.5 Å sebanyak minimal 20 kali.

2.3.5. Penambatan Molekuler.

Penambatan molekuler dilakukan menggunakan *AutoDock Tools* 1.5.6 dan *AutoDock Vina* (*Scripps Research Institute, USA*). File reseptor dan ligan yang telah dipreparasi di simpan dengan format PDBQT. File yang sudah disimpan kemudian diletakkan dalam folder yang sama yakni folder vina yang diletakkan dalam folder C. Penambatan molekuler diawali dengan menggunakan program “*command prompt*” atau cmd dan dilakukan proses pemerintahan program yang berada dalam folder vina. Perintah yang dituliskan yaitu “--config conf.txt --log log.txt”. Hasil penambatan molekuler dengan perintah dari program cmd dibuka dengan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* untuk melihat nilai perubahan energi bebas Gibbs (ΔG). Dokumen kemudian di simpan dengan aplikasi LigPlot+.

2.3.6. Analisis Hasil Penambatan Molekuler

Analisis hasil penambatan berupa energi bebas pengikatan dari beberapa mode dalam format log.txt dan nilai konstanta inhibisi (KI). Visualisasi tiga dimensi ikatan kimia dan residu asam amino dilakukan menggunakan LigPlot+. Hasil diujikan dengan rumus $\Delta G = RT \ln KI$ untuk didapatkan nilai energi bebas pengikatan.

2.3.7. Simulasi Dinamika Molekul (MD)

Preparasi gabungan reseptor 4NRE dan ligan uji terbaik Nandrolone phenylpropionate dan Sofalcone dilakukan dengan pymol kemudian dilakukan analisis dengan YASARA-Structure. Simulasi menggunakan makro “md_run.mcr” dengan pemilihan waktu 10 ns, penambahan “AddSpring”, serta tiap 10 ps lintasan simulasi disimpan. Fisik sel diatur pada suhu 310K, pH 7,4, dan NaCl 0,9%.

2.3.8. Analisis Hasil Simulasi MD

Analisis hasil simulasi menggunakan “md_analyze.mcr” pada YASARA-Structure. Analisis yang dipilih yakni perhitungan *Root Mean Square Deviation* (RMSD), jari-jari girasi, *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), dan *Solvent-Accessible Surface*

Area (SASA). Hasil analisis kemudian disimpan dalam bentuk *file notepad* dan diolah menggunakan *Microsoft Excel*.

3. Hasil

3.1. Prediksi bioavailabilitas dan toksisitas ligan

Ligan uji terpilih dari daun sirih merah dilakukan analisis stabilitas berdasarkan aturan Lipinski dan toksisitas dengan *admetSAR* 1.0 sebelum diujikan pada protein target. Prediksi bioavailabilitas ligan menggunakan ligan uji sebanyak 61 ligan. Ligan kemudian dilakukan analisis stabilitas ligan dengan hasil sebanyak 3 ligan uji yakni Rutin, Isocaviunin 7-O, dan ChEMBL2398181 melanggar lebih dari 2 aturan Lipinski. Rutin senyawa dari ekstrak etanol melanggar 4 aturan, Isocaviunin 7-O senyawa dari fraksi etil asetat melanggar 4 aturan, dan ChEMBL2398181 senyawa dari fraksi air melanggar 3 aturan. Ligan uji tersisa yakni sebanyak 58 ligan lainnya yang telah memenuhi syarat lima aturan Lipinski sehingga dapat menjadi kandidat sebagai ligan penghambat protein target yang tergolong stabil.

Prediksi toksisitas menjadi salah satu kunci dalam penemuan berbagi obat-obatan yang berguna untuk menilai tingkat bahaya suatu senyawa pada lingkungan dan manusia. Uji toksisitas juga diujikan menggunakan perangkat lunak *admetSAR* 1.0 dengan tiga parameter kontrol yaitu *human ether a go-go related gene* (herG), karsinogenik, dan toksisitas oral akut pada tikus. Semua ligan masuk kedalam kategori inhibitor lemah untuk inhibisi *human ether a go-go related gene* (herG). Beberapa ligan didapatkan masuk kedalam kategori karsinogenik yakni asam propionat, neophytadiene, beta-ocimene, beta-myrcene, butil etanoat, asam asetat, leusilleusin amida hidroklorida (1:1), dan ChEMBL569003. Kategori toksisitas oral akut pada tikus juga telah dilanggar oleh beberapa ligan yaitu columbin, Isobenzofuran-4,7-dione, Methyl 6-hidroxyangolensate dan methyl 2-[14-acetyloxy-6-(furan-3-yl)-1,5,15,15-tetramethyl-8,17-dioxo-7-oxatetracyclo [11.3.1.02,11.05,10] heptadeca-10,13-dien-16-yl] acetate.

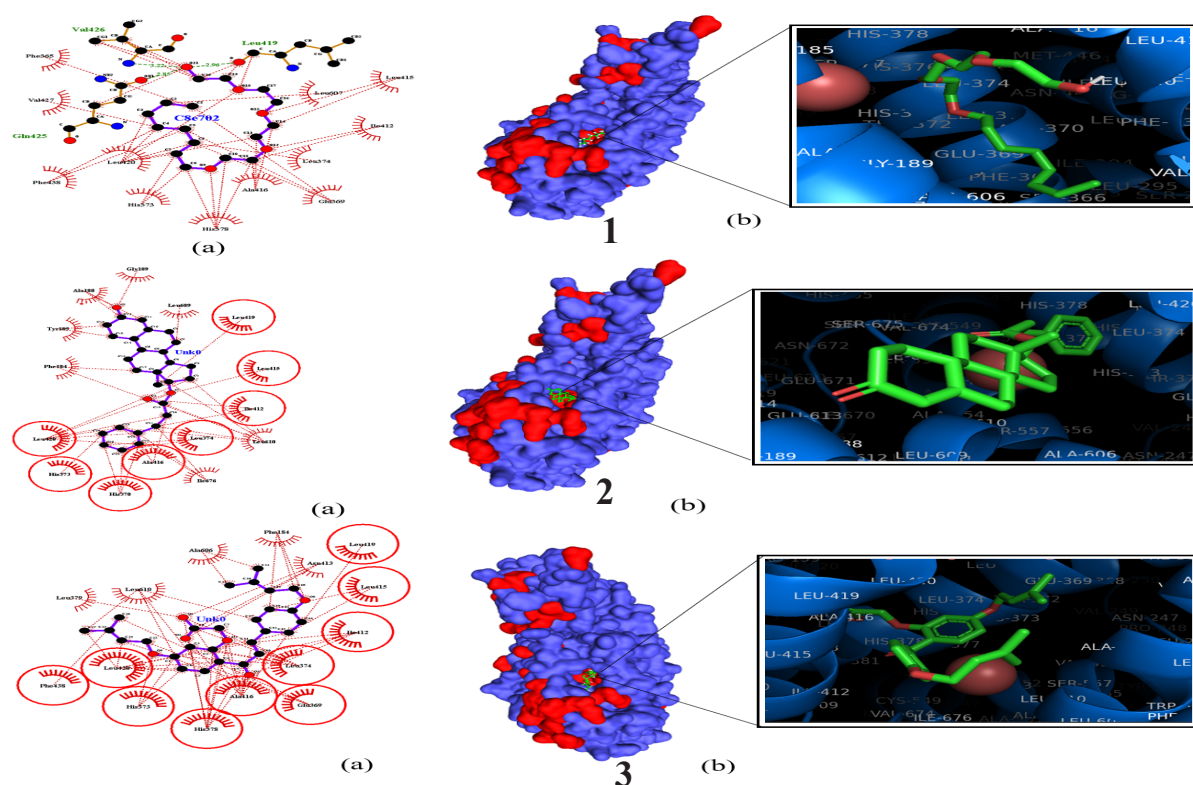
3.2. Validasi metode penambatan molekuler

Validasi grid box merupakan langkah awal untuk menentukan titik koordinat yang tepat dengan sisi aktif reseptor 4NRE oleh ligan alami. Selain itu, hasil validasi akan memberikan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) serta energi bebas pengikatan. Validasi menggunakan perangkat lunak *Autodock Tools* 1.5.6 dan *Autodock vina* menggunakan ligan alami C8E dari 4NRE dengan reseptor lipoksigenase 4NRE. validasi dilakukan sebanyak 20 kali ulangan dengan menghasilkan daerah pusat pusat $x=11.646$, $y=-57.414$, $z=-23.690$ dan dimensi $x=28$, $y=20$, dan $z=30$. Validasi mendapatkan nilai RMSD rata-rata sebesar 1.9161 dengan nilai energi bebas pengikatan sebesar -5.4 kkal/mol.

3.3. Penambatan Molekuler dan Energi Bebas Pengikatan

Penambatan molekuler dilakukan dengan Visualisasi 2D ligplot+ dan 3D *discovery studio* untuk menunjukkan ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen berdasarkan interaksi residu asam aminonya. Reseptor 4NRE memiliki residu asam amino yang merupakan sisi katalitik yang diperlukan untuk penghambatan kinerja enzim sebagai inhibitor kompetitif yakni residu His373, His378, dan His553 yang berikatan secara hidrofobik. Ligan alami (gambar 1), ligan uji terbaik *Nandrolone Phenylpropionate*, dan *Sofalcone* berikatan secara hidrofobik dengan 2 residu asam amino penting yang terikat pada sisi aktif enzim yakni His373 dan His378.

Penambatan molekuler memiliki parameter dalam analisisnya untuk menentukan kualitas ligan uji dengan menggunakan energi bebas pengikatan (ΔG) dan nilai Konstanta Inhibisi (K_i). Banyaknya energi bebas pengikatandidapatkan dari 20 moda dari konformasi terbaik. Hasil penambatan molekuler menggunakan ligan uji ekstrak etanol, ekstrak n-heksan, fraksi n-heksan, fraksi etil dan fraksi air yang baik menghasilkan nilai $\Delta G < 0$. Ligan uji dengan energi bebas pengikatan terbaik yakni *Nandrolone Phenylpropionate* ligan ekstrak etanol dengan energi bebas pengikatan sebesar



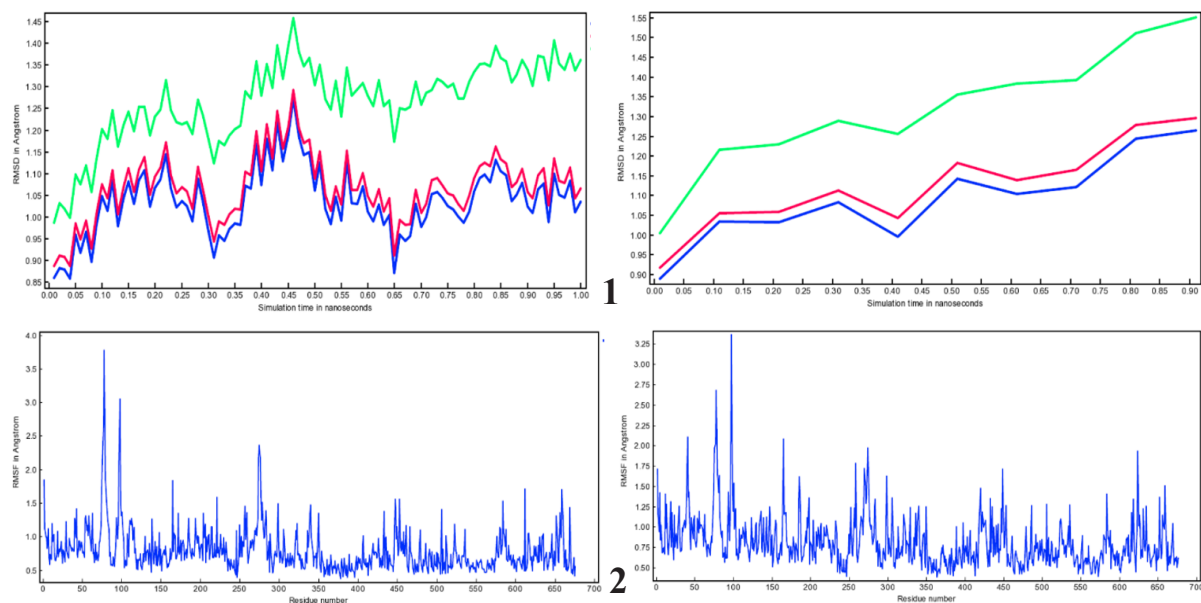
Gambar 1. (1) Visualisasi *Docking Molekuler* ligan alami C8E, (2) Visualisasi *Nandrolone phenylpropionate*, dan (3) Visualisasi *Sofalcone A*) diagram 2D ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara ligan-reseptor; B) Kantong pengikat 4NRE 3D

-10.4 kkal/mol memiliki nilai K_i sebesar 0.0023 μM dan *Sofalcone* ligan fraksi air dengan energi bebas pengikatan sebesar -9.1 kkal/mol memiliki nilai K_i sebesar 0.021 μM (Tabel 2).

3.4. Dinamika Molekular

Analisis dinamika molekul menganalisis kestabilan struktur atas 4 dasar yakni *Root Mean Square Deviation* (RMSD), jari-jari girasi (RG), *Solvent-Accessible Surface Area* (SASA), dan *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) terhadap ligan uji terbaik *Nandrolone Phenylpropionate* dan *Sofalcone*. Hasil nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) (Gambar 2) menginterpretasikan kecocokan struktur protein tiap perubahan waktu. Jarak yang terlalu jauh dari struktur sebelumnya menunjukkan stabilitas protein yang kurang baik. Nilai RMSD yang dihasilkan *Nandrolone phenylpropionate* berada pada rentang 0.988-1.459 Å dengan rata-rata sebesar 1.267 Å. Nilai RMSD yang dihasilkan *Sofalcone* berada pada rentang 1.004 - 1.552 Å dengan rata-rata sebesar 1,319 Å. Hasil RG (gambar 3) didapatkan dari *Nandrolone Phenylpropionate* memiliki rata-rata 28.268

Å pada rentang 28.098-28.417 Å. Hasil RG *Sofalcone* memiliki rata-rata sebesar 28.341 Å dengan rentang 28.178-28.418 Å. Kedua ligan memiliki rentang RG tidak terlalu jauh selama simulasi dan cukup untuk dikatakan stabil untuk volume protein dan cukup kompak. Analisis stabilitas selanjutnya dilakukan dengan analisis SASA untuk melihat luas permukaan dan pola pengikatanannya pada ligan. Ligan *Nandrolone phenylpropionate* dan *Sofalcone* memberikan grafik yang cukup stabil yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan grafik secara signifikan. Hasil tersebut menunjukkan kedua ligan tergolong stabil dan interaksi antara ligan dan reseptor kompak dan baik. Analisis interaksi reseptor dengan ligan ditentukan oleh analisis RMSF yang menunjukkan pergeseran keadaan struktur residu protein mengenai kekakuannya selama simulasi. Kedua ligan menghasilkan simpangan terkecil pada residu asam amino HIS373 dan HIS378 yang merupakan sisi katalitiki enzim 4NRE dengan nilai dibawah 1.4 Å sehingga ikatan reseptor dan ligan tergolong baik.



Gambar 2. (1) RMSD (Root Mean Square Deviation) dan (2) RMSF (Root Mean Square Fluctuation) Nandrolone Phenylpropionate (kiri) dan Sofalcone (kanan)

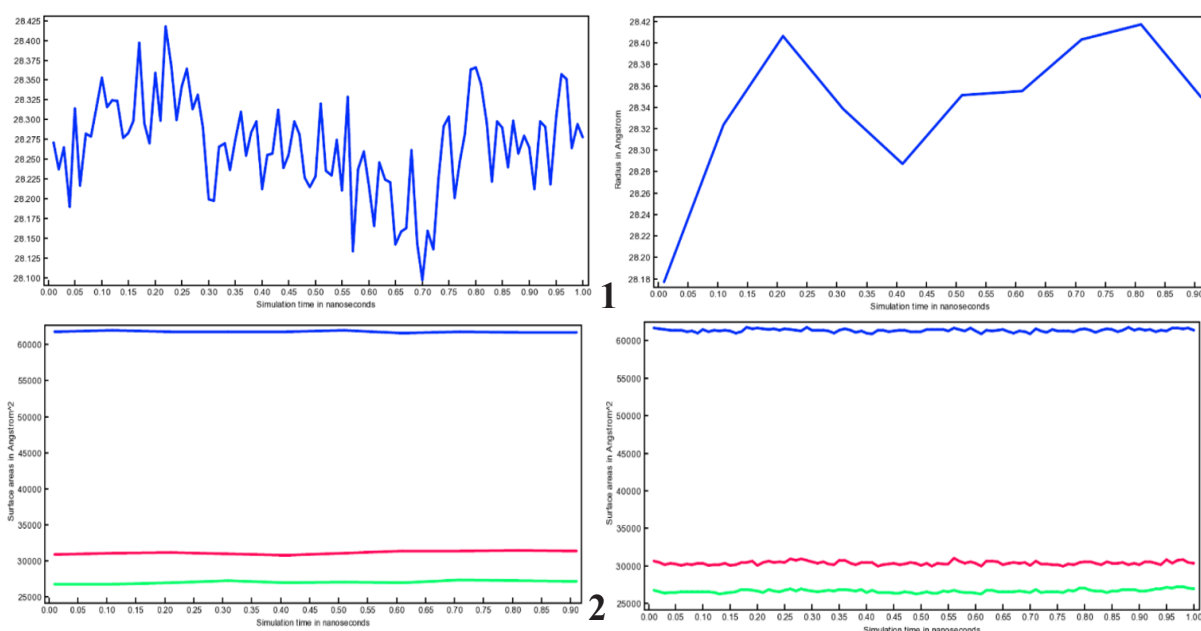
4. Pembahasan

4.1. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Pemilihan reseptor dengan kode 4NRE didasarkan atas struktur kristal 4NRE yang bersifat original protein template. Struktur 15-LOX dengan kode pdb 4NRE memiliki struktur yang analog dengan asam arakidonat karena memiliki rongga serta tempat pengikatan asam amino yang homolog²¹. Selain itu, reseptor juga memiliki kompleks dengan inhibitor yang bekerja sebagai substrat analog sehingga dapat dijadikan acuan untuk melakukan desain obat yang bersifat kompetitif inhibitor. Reseptor dengan

resolusi medium berada pada kisaran 2.00 Å sampai 2.70 Å sehingga reseptor 4NRE dengan resolusi sebesar 2.63 Å dari manusia tergolong medium dan layak untuk menjadi reseptor untuk desain obat²².

Struktur 4NRE kemudian dilakukan validasi sebelum dilanjutkan ke tahap penambatan molekuler. Metode penambatan molekuler merupakan langkah awal untuk menentukan titik koordinat yang tepat sehingga ligan dapat terarahkan ke sisi aktif reseptor. Validasi menggunakan *Autodock tools* 1.5.6 dan *Autodock vina* dengan memisahkan inhibitor alami protein kemudian dilakukan



Gambar 3. (1) Jari-jari girasi (RG) dan (2) SASA (Solvent-Accessible Surface Area) Nandrolone Phenylpropionate (kiri) dan Sofalcone (kanan)

Tabel 2. Energi bebas pengikatan dan ikatan antar residu asam amino

Ligan	Jarak Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrogen	Atom pada ligan	ikatan hidrofobik	Energi Bebas Ikatan	Ki (μM)
Ligan alami 4NRE (C8E)	2.96	Leu419	O21	Phe365, Val427, Phe438, Ile412, Leu420,	-5.4	10.898
	3.22	Val426	O21	His373, His378, Ala416, Glu369, Leu374,		
	2.85	Gln425	O21	Leu607, Leu415		
beta-amirin (73145)				Val426, Leu420, Ala416, Ile412, Leu419,	-9.6	0.0090
				Leu415		
Spathulenol (92231)				Val426, Leu420, Leu419, Leu415	-7.0	0.7299
Beta-Caryophyllene (5281515)				Leu415, Ile412, Ala416, Leu420	-7.4	0.3713
Humulene (5281520)				Leu420, Ile412, Leu415, Leu419, Ala416	-7.5	0.3135
Kaempferitrin (5486199)				Gln425	-7.4	0.3713
Germacrene D (5317570)				Leu420, Ala416, Ile412, Leu419, Leu415	-7.2	0.5206
Elemicin (10248)				Leu415, Leu419, Ile412, Ala416, Leu420	-5.6	7.7734
Phytol (5280435)				Phe365, Val426, Val427, Leu420, Phe438,	-7.1	0.6164
				His373, His378, Ala416, Glu369, Leu374,		
				Ile412, Leu607, Leu415, Leu419		
beta-Bisabolene (10104370)				Phe365, Val426, Leu420, Ile412, Phe438,	-7.3	0.4396
				His373, His378, Ala416, Glu369, Leu374		
Sulfamethoxazole (5329)				Leu420, Phe438, His373, His378, Ala416,	-7.5	0.3135
				Glu369, Leu374, Ile412, Leu607		
Nandrolone Phenylpropionate (229455)				Leu420, His373, His378, Ala416, Leu374,	-10.4	0.0023
				Ile412, Leu419, Leu415		
Thiamine nitrate (10762)				Val 426, Ala416 Leu420, Ile412, Leu419,	-6.1	3.3396
				Leu415		
Anthocyanin (145858)				Phe365, Val 426, Leu420, Phe438,	-7.9	0.1595
				His373, His378, Glu369, Leu374, Leu607		
Alfa pinen (82227)				Phe365, Val 426, Val427, Leu420, Phe438,	-5,8	5.5443
				Glu369, Leu607		
Limonen (22311)				Phe365, Val 426, Leu420, Phe438,	-6.4	2.0116
				His373, Leu374, Glu369		
Cineol-1,8 (2758)				Leu420, Leu415, Leu419	-5.3	12.905
Terpinen-4-ol (11230)	2.94	Glu369	O	Phe365, Val 426, Leu420, Phe438,	-6.5	1.6989
				His373, Lue607		
L-(+)-Arginin hidroklorida (66250)				Leu415, Leu374, Ala416, His378, His373,	-5.0	21.424
				Phe438, Leu420		
1-(1,4-Ditian-2-ylmetil)-3- (3-metoksi propil) tiourea (116510220)	2.97	Glu369	N3	Phe365, Val426, Leu420, Phe438, His373,	-4.8	30.037
	2.81	Ile412	O1	His378, Ala416, Leu374, Leu607		
4-Metoksi indole (138363)				Val427, Leu607, Leu420, Phe438, His373,	-5.1	18.093
				His378, Glu369, Leu374		
Metil eugenol (7127)	3.20	Ile412	O4	Leu420, Phe438, His373, His378, Ala416,	-5.6	7.7734
	3.07	Glu369	O2	Leu374		
Asam protokatekuat (72)				Leu420, His373, His378, Ala416, Leu374	-5.8	5.5443
CHEMBL3217136 (90665169)					-5.8	5.5443
1H-pyrazole-1- carboximidamidmid hydrochloride (2734672)					-4.7	35.5674

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol (1511955)					-6.9	0.8642
Ni-(5-methylisoxazole-3-yl) ethanediamide (2805645)				Leu420, Phe438, His373, His378, Glu369, Leu374, Leu607	-5.8	5.5443
MLS000557666 (1077234)				Val426, Leu420, Ala416, Ile412, Leu415, Leu419	-9.0	0.0248
Ethyl L-serinate hydrochloride (2724185)	3.10	His373	O3	Leu420, Leu374	-4.2	82.7868
	2.35	His373	FE			
	2.90	His378	O3			
	2.21	His378	FE			
6XO32ZSP1D (75019)				Leu420, His378, Ala416, Ile412, Leu415, Leu419	-6.0	3.9544
Schisandrin B (108130)				Val426, Leu420, Gln425, Leu419	-6.9	0.8642
6-Amino-4-[3-(benzyloxy)phenyl]-3-tert-butyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c] pyrazole-5-carbonitrile (2865476)				Leu420, Gln425, Leu415, Leu419	-8.4	0.0685
CHEMBL216163 (44418672)	2.80	Gln425	N3	Leu420, Ala416, Ile412, Leu415	-7.5	0.3135
	3.13	Val426	N3			
Flemiphipillin A (10074228) (3R,4R,5R)-3,4-Bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)-methyl) dihydrofuran-2(3H)-one (562066)				Gln425, Leu420, Leu419	-8.6	0.0488
				Val426, Leu420, Leu415, Leu419	-7.8	0.1888
[(1S,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-Diacetyloxy-9,15-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyclo [11.3.1.03,10.04,7] heptadec-13-en-1-yl] benzoate (9985480)	2.70	Leu419	O10	Val426, Leu420, Gln425, Ala416, Ile412, Leu415	-8.8	0.0348
CHEMBL518595 (44578655)				Val426, Leu420, Ala416, Leu415, Leu419	-9.7	0.0076
5-[Bis(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyl) methyl]-2-methoxybenzyl acetate (3754322)				Val426, Gln425, Leu420, Ala416, Leu415, Ile412, Leu419	-8.5	0.0578
Euphorbiasteroid (15940183)				Val426, Gln425, Leu420, Ala416, Leu415, Ile412, Leu419	-8.4	0.0685
Guanidine tartrate (18533741)					-4.7	35.5674
Ingenol-3-Benzate (44292399)				Gln425, Leu420, Ala416, Leu415, Leu419	-8.9	0.0294
Lankacidin C (6440871)				Val426, Gln425, Leu420, Ala416, Leu415, Ile412, Leu419	-8.5	0.0578
Methyl 3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-3-(4-(octyloxy) phenyl) propanoate (91636868)				Leu420, Phe438, His373, His378, Ala416, Glu369, Leu415, Leu374, Leu419	-8.1	0.1137

N-(Decanoyl) piperidine (4130169)	Val426, Val427, Phe438, Leu420, His373, His378, Ala416, Glu369, Leu374, Ile412, Leu607	-7.3	0.4396
Phthalic anhydride (6811)		-5.7	6.5649
Sofalcone (5282219)	Phe438, Leu420, His373, His378, Ala416, Glu369, Leu374, Ile412, Leu415, Le419	-9.1	0.021
Urapidil (5639)	Val426, Leu420, Ala416, Leu419, Leu415	-7.2	0.5206

penempelan kembali untuk memastikan titik pengikatan menyerupai celah situs aktif dengan sedikit penyimpangan²³. Validasi akan menghasilkan koordinat *grid box* yang menunjukkan posisi kantong situs aktif yang tepat.

Hasil validasi memberikan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) yang bertujuan untuk melihat perbedaan orientasi pengikatan kristalografi pada sisi aktif protein dari beberapa pose dengan menggunakan ligan yang sama. Nilai RMSD memiliki tiga nilai yakni $\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$, RMSD antara 2.0 dan 3.0 $\text{ \AA}$, dan $\text{RMSD} > 3.0 \text{ \AA}$. Nilai $\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa posisi tepat, RMSD antara 2.0 dan 3.0 $\text{ \AA}$ menunjukkan posisi yang masih dapat diterima dengan kemungkinan sedikit penyimpangan, dan $\text{RMSD} > 3.0 \text{ \AA}$ menunjukkan posisi yang salah²⁴. Merujuk dari kriteria validasi yang baik, hasil validasi metode penambatan molekuler struktur 4NRE dengan ligan alaminya menghasilkan hasil yang baik dengan titik koordinat *grid box* yang valid sehingga dapat dijadikan acuan sebagai posisi yang tepat untuk melakukan penambatan molekuler.

4.2. Prediksi bioavailabilitas dan toksisitas ligan

Prediksi bioavailabilitas ligan diperlukan untuk penemuan suatu obat khususnya untuk obat oral dan daya serapnya. Analisis stabilitas dilakukan menggunakan lima aturan *Lipinski* yaitu berat molekul tidak lebih dari 500 kDa, donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5, akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10, nilai Log P tidak lebih besar dari 5, dan refraktivitas molar berada diantara 40-130²⁵. Ligan uji sebanyak 61 ligan telah dilakukan analisis stabilitas ligan dengan hasil sebanyak 3 ligan uji yakni Rutin, Isocaviunin 7-O, dan ChEMBL2398181 melanggar lebih dari 2 aturan *Lipinski* sehingga tersisa 58

ligan lainnya yang telah memenuhi syarat lima aturan *Lipinski* sehingga dapat menjadi kandidat sebagai ligan penghambat protein target yang tergolong stabil.

Massa atom relatif berkaitan dengan kemampuan suatu senyawa untuk berdifusi menembus membran biologis sehingga dibutuhkan ukuran senyawa yang kecil agar mudah menembus membran biologis²⁶. Aturan donor dan akseptor ikatan hidrogen menunjukkan kemampuan suatu senyawa dalam mengikat protein, semakin besar nilainya maka semakin sulit pemutusan ikatannya sehingga dibutuhkan energi yang lebih besar agar proses penyerapan senyawa terjadi²⁷. Nilai Log P berkorelasi dengan gugus polar senyawa sehingga semakin kecil nilai Log P maka semakin kuat sifat hidrofilik suatu senyawa²⁸. Nilai refraktivitas molar dibawah 130 menyatakan permeasi yang baik²⁹.

Prediksi toksisitas menjadi langkah selanjutnya setelah prediksi bioavailabilitas yang merupakan kunci untuk menemukan berbagai obat-obatan yang berguna untuk menilai tingkat bahaya suatu senyawa pada lingkungan dan manusia. Prediksi toksisitas suatu senyawa dilakukan menggunakan admetSAR dengan 3 parameter yang kontrol pada penelitian ini yaitu *human ether a go-go related gene* (herG), karsinogenik, dan toksisitas oral akut pada tikus yang dipilih sebagai keterkaitannya untuk penemuan obat terkait inflamasi. Suatu senyawa dikatakan lolos uji toksisitas apabila parameter *human ether a go-go related gene* (herG) bersifat inhibitor lemah, tidak karsinogenik, dan toksisitas oral akut berada pada golongan III atau IV¹¹. Ligan uji sebanyak 58 ligan hasil saringan uji *Lipinski* telah di uji toksisitas dengan admetSAR dengan menghasilkan sebanyak 12 ligan uji melanggar satu dari tiga syarat toksisitas sehingga ligan yang layak

dilanjutkan untuk dilakukan penambatan molekuler sebanyak 46 ligan.

4.3. Simulasi penambatan molekuler

Penambatan molekuler memiliki parameter dalam analisisnya untuk menentukan kualitas ligan uji dengan menggunakan nilai energi bebas pengikatan (ΔG) dan nilai konstanta inhibisi (K_i). Banyaknya energi bebas pengikatan didapatkan dari 20 mode dari konformasi terbaik. Hasil penambatan molekuler menggunakan ligan uji ekstrak etanol, ekstrak n-heksan, fraksi n-heksan, fraksi etil dan fraksi air menghasilkan nilai $\Delta G < 0$. Ligan uji dengan energi bebas pengikatan terbaik yakni *Nandrolone Phenylpropionate* dengan energi bebas pengikatan sebesar -10.4 kkal/mol. Hal tersebut disebabkan karena semakin negatif nilai energi bebas pengikatan maka semakin baik pengikatan ligan terhadap protein target³⁰. Parameter nilai K_i berbanding lurus dengan energi bebas pengikatan. Nilai K_i menunjukkan pengikatan suatu ligan sebagai inhibitor kompetitif dengan rentan nilai micromolar yang rendah³¹. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dikatakan semua ligan uji yang diujikan pada penelitian ini memenuhi syarat sebagai inhibitor yang berikatan kuat dengan nilai K_i terbaik yaitu *Nandrolone Phenylpropionate* sebesar 0.00233 μM .

Visualisasi reseptor dengan ligan alami maupun ligan uji menggunakan Visualisasi ligplot+ dengan menunjukkan beberapa ikatan yakni ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen berdasarkan interaksi residu asam aminonya³². Protein target 4NRE memiliki residu asam amino yang merupakan sisi katalitik yang diperlukan untuk penghambatan kinerja enzim sebagai inhibitor kompetitif yakni residu His373, His378 dan His553 yang berikatan secara hidrofobik pada konformasi bentuk U enzim³³. Ligan uji yang di visualisasinya menghasilkan ligan terbaik yakni *Nandrolone Phenylpropionate* dan *Sofalcone* berikatan secara hidrofobik dengan dua residu asam amino yang terikat pada sisi aktif enzim lipoksigenase yaitu His373 dan His378. Selain itu, *Nandrolone Phenylpropionate* berikatan

secara hidrofobik dengan residu Leu420, Ala416, Leu374, Ile412, Leu419, Leu415 dan *Sofalcone* berikatan secara hidrofobik dengan residu Phe438, Leu420, Ala416, Glu369, Leu374, Ile412, Leu415, Leu419. Beberapa senyawa metabolit sekunder dapat menjadi analog asam arakidonat dan fenolat yang berperan untuk menghambat kinerja enzim lipoksigenase yang berikatan pada sisi aktifnya⁷. Oleh karena itu, kedua senyawa aktif ini berpotensi sebagai inhibitor enzim lipoksigenase.

4.4. Dinamika Molekul

Simulasi MD dilakukan untuk memperkirakan stabilitas interaksi antara reseptor dengan ligan uji dengan kondisi lingkungan yang menyerupai lingkungan fisiologis tubuh manusia³⁴. Nilai RMSD dua ligan terbaik dari *nandrolone propionate* dan *sofalcone* memiliki rata-rata sebesar 1.267 Å dan 1,319 Å. Nilai tersebut kurang dari 2 Å yang menandakan bahwa mode pengikatan reseptor dengan kedua ligan tersebut stabil³⁵. Simulasi dilakukan selama 10ns untuk melihat nilai RMSD backbone yang berfungsi sebagai indikator keseimbangan pengikatan dengan tidak adanya perubahan konformasi. Hasil ini juga menandakan bahwa ligan uji *Nandrolone Phenylpropionate* dan *Sofalcone* bertindak sebagai ligan kompetitif yang berpotensi menstabilkan secara keseluruhan struktur protein.

Jari-jari girasi (RG) menentukan pusat massa zat terlarut untuk menunjukkan besar volume dan kekompakan suatu protein sehingga menjadi salah satu penentu kestabilan protein. Semakin tinggi nilai RG maka konformasi protein semakin fleksibel dengan volume protein yang longgar³⁶. Kedua ligan memiliki rentang RG yang tidak jauh antara nilai RG terkecil hingga terbedasar dengan rata-rata yakni *Nandrolone Phenylpropionate* dan *Sofalcone* sebesar 28.268 dan 28.341 Å. Hasil ini menunjukkan bahwa protein dalam kondisi stabil dengan kompak dengan volume sedikit longgar. Nilai Rg yang lebih tinggi menunjukkan pengepakan yang longgar dari struktur protein, yang berarti konformasi protein lebih

fleksibel³⁶.

Analisis SASA dilakukan untuk melihat stabilitas protein berdasarkan luas permukaan dan pola pengikatan atom yang terdapat pada permukaan untuk melakukan kontak dengan pelarut³⁷. Hasil analisis SASA pada kedua ligan memiliki hasil yang cukup stabil. Ligan *Sofalcone* memiliki beberapa perubahan nilai pada beberapa ns namun masih cukup stabil. Ligan *Nandrolone Phenylpropionate* memiliki grafik yang stabil pada tiap ns. Hal ini menunjukkan bahwa kedua ligan membentuk kompleks yang lebih kompak dengan tidak mengubah luas permukaannya. Selain itu, nilai yang SASA yang stabil menunjukkan bahwa volume situs aktif dan hidrofobisitas total stabil sehingga dapat mempertahankan interaksi dengan residu poket secara maksimal³⁴.

Interaksi reseptor dengan ligan dipengaruhi oleh peran residu asam amino yang akan mempengaruhi kekakuan dari seluruh protein. Analisis peran residu dilakukan dengan penilaian RMSD untuk menghitung simpangan rata-rata dari tiap residu selama simulasi³⁸. Analisis RMSF menghasilkan tren terhadap residu asam amino dengan interpretasi yakni puncak menandakan ligan tidak berikatan dengan residu sehingga menjadi tidak kaku dan lembah menunjukkan adanya interaksi ligan dengan residu sehingga struktur menjadi kaku³⁴. Semakin kecil nilai RMSF maka semakin baik ikatan antara ligan dengan residu dengan syarat nilai RMSF dibawah $1.4 \text{ \AA}$ ³⁸. Kedua ligan memiliki nilai RMSF terendah pada residu HIS373 dan HIS378 yang merupakan sisi katalitik dari reseptor 4NRE sehingga kedua ligan ini menjadi ligan memiliki kekuatan penghambatan terbaik secara kompetitif.

5. Kesimpulan

Senyawa daun sirih merah yang mampu menghambat enzim lipoksigenase yakni ligan uji *Nandrolone Phenylpropionate* dari ekstrak etanol dan *Sofalcone* dari fraksi air yang telah lolos analisis stabilitas dan prediksi toksisitas. Ligan uji memiliki energi bebas pengikatan sebesar -10.4 kkal/mol dan -9.1

kkal/mol dengan nilai KI sebesar 0.0023 μM dan 0.021 μM . Kedua ligan berikatan dengan sisi aktif enzim 4NRE yakni pada residu asam amino His373 dan His378 secara hidrofobik. Struktur protein dengan kedua ligan terbaik memberikan hasil yang stabil berdasarkan analisis dinamika molekul.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih diberikan kepada Indonesia Collaborative Research–WCU (World Class University) Fiscal Year 2020 Number: 1755/IT3.L1/PN/2020/IT3.L1/PN/2020 atas nama Dr. Mega Safithri, S.Si, M.Si yang telah mendanai penelitian ini, Rini Kurniasih S.Si, M.Si dan Riyan Alifbi Putera Irsal, S.Si yang telah berperan dalam penulisan jurnal.

Referensi

- [WHO] World Health Organization. Noncommunicable disease. [diacu 2022 Maret 21]. Tersedia dari: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Yuslianti ER. Pengantar radikal bebas dan antioksidan. Yogyakarta: Deepublish. 2018
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Situasi kesehatan jantung [internet]. [diunduh 2022 Maret 22]. Tersedia dari <https://pusdatin.kemkes.go.id>.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Tetap produktif, cegah, dan atasi diabetes melitus [internet]. [diunduh 2022 Maret 22]. Tersedia dari <https://pusdatin.kemkes.go.id>.
- Fanelli A, Ghisi D, Aprile PL, Lapi F. Cardiovascular and cerebrovascular risk with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase 2 inhibitors: latest evidence and clinical implications. *Ther. Adv. Drug. Saf.* 2017;8(6): 173-182.
- Lončarić M, Strelec I, Pavić V, Šubarić D, Rastija V, Molnar M. Lipoxigenase inhibition activity of coumarin derivatives qsar and molecular docking study. *Pharmaceuticals*. 2020; 13(154): 1-19.
- Tomy MJ, Dileep KV, Prasanth S,

- Preethidan DS, Sabu A, Sadasivan C, Haridas M. Cuminaldehyde as a lipoxygenase inhibitor:in vitro and in silico validation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 174:388–397.
8. Safithri M, Kurniawati A, Syaefudin. Formula of Piper crocatum, Cinnamomum burmanii, and Zingiber officinale extracts as a functional beverage for diabetics. *IFRJ*. 2016; 23(3):1123-1130.
 9. Prayitno SA, Kusnadi J, Murtin ES. Karakteristik (total flavonoid, total fenol, aktivitas antioksidan) ekstrak serbuk daun sirih merah (Piper crocatum Ruiz & Pav.). *Foodscitech*. 2018; 1(2): 26-34.
 10. Afagnigni AD, Nyegue MA, Djova SV, Etoa FX. LC-MS analysis, 15-lipoxygenase inhibition, cytotoxicity, and genotoxicity of dissotis multiflora (Sm) triana (Melastomataceae) and Paullinia pinnata linn (Sapindaceae). *Journal of Tropical Medicine*. 2020; 2020:1-8.
 11. Alaba CSM, Chichioco-Hernandez, CL. 15-Lipoxygenase inhibition of Commelina benghalensis, Tradescantia fluminensis, Tradescantia zebrina. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014; 4(3): 184–188.
 12. Afifah S, Lukiati B, Maslikah SI. The potentials of red betel (Piper crocatum Ruiz & Pav) terpenoid compounds as Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) enzyme inhibitor of rheumatoid arthritis through virtual screening. *Proceedings of The 3rd International Seminar on Metallurgy and Materials (ISMM2019): Exploring New Innovation in Metallurgy and Materials*; 22 April 2020; AIP Conference Proceedings 2231; 2020
 13. Amalia A, Maslikah SI, Lestari SR. Virtual screening flavonoid compounds from red betel (Piper crocatum Ruiz & Pav.) as inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Proceedings of The 3rd International Seminar on Metallurgy and Materials (ISMM2019): Exploring New Innovation in Metallurgy and Materials*; 22 April 2020; AIP Conference Proceedings 2231; 2020
 14. Anugrahwati M, Purwaningsih T, Rustina, Manggalarini JA, Alnavis NB, Wulandari DN, Pranowo HD. Extraction of ethanolic extract of red betel leaves and its cytotoxicity test on HeLa cells. *Procedia Engineering*. 2016; 148(2016): 1402-1407.
 15. Wahjuni S, Sukadana IM, Arisanti LP. Red Piper crocatum leaves extract ethanol lowering malondialdehyde (mda) and blood glucose level in hyperglycemic wistar rat. *Jurnal of Global Pharma Technology*. 2017; 5(9):59-64.
 16. Irawan C, Foliatini, Hanafi. GC-MS composition of leaf extract of Piper cf. arcuatum blume and their antioxidant activity and toxicity studies. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015; 6(4): 461-468.
 17. Ramadani F. Aktivitas antioksidan, total tanin ekstrak dan fraksi daun sirih merah (Piper crocatum) dan identifikasi dengan LC-MS (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2018
 18. Wedasari IAI. Aktivitas ekstrak etanol dan fraksi daun sirih merah (Piper crocatum) dengan metode rancimat dan identifikasi dengan LC-MS (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2018
 19. Septiani R. Ekstrak dan fraksi daun sirih merah (Piper crocatum Ruiz & Pav) sebagai antioksidan dengan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2017
 20. Safithri M, Kurniawati A, Syaefudin. Formula of Piper crocatum, Cinnamomum burmanii, and Zingiber officinale extracts as a functional beverage for diabetics. *IFRJ*. 2016; 23(3): 1123-1130.
 21. Venugopala KN, Govender R, Khedr MA, Venugopala R, Aldhubiab BE, Harsha S, Odhav B. 2015. Design, synthesis, and computational studies on dihydropyrimidine scaffolds as potential lipoxygenase inhibitors and cancer chemopreventive agents. *Drug Design, Development and Therapy*. 9: 911–921
 22. Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. 2007. Protein crystallography for

- non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal*. 275(1): 1–21.
23. Shivanuka C, Deepak KS, Venkataraghavan R, Pawan T, Sumitha A, Brindha DP. Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS-CoV-2 main-protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020; 1:1–27.
 24. Ramírez D, Caballero J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? *Molecules*. 2018; 23(5):1-17.
 25. Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TIBDDCS. the Rule of 5 and Drug ability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 2016:1-10.
 26. Ruswanto. Molecular docking empat turunan isonicotinohydrazide pada *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 2015; 13(1): 135-141.
 27. Syahputra G, Ambarsari L, Sumaryada T. Simulasi docking kurkumin enol, bisdemetoksikurkumin dan analognya sebagai inhibitor enzim 12- lipoksigenase. *J. Biofisika*. 2014; 10(1): 55-67.
 28. Halligudi N, Mullaicharam AR, Al-bahri HS. Molecular modification of ibuprofen using in silico modeling system. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 2022; 2(2):156-162.
 29. Daddam JR, Sreenivasulu B, Peddanna K, Umamahesh K. Designing, docking and molecular dynamics simulation studies of novel cloperastine analogues as anti-allergic agents: homology modeling and active site prediction for the human histamine H1 receptor. *RSC Advances*. 2020; 10(8):4745–4754.
 30. Dallakyan S, Olson AJ. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2015; 1263:243-250.
 31. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules*. 2017; 22(7): 1-46.
 32. Sun R, XU G, Dongyang G, Ding Q, Shi Y. 2021. To predict anti-inflammatory and immunomodulatory targets of guizhi decoction in treating asthma based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation. *Hindawi*. 2021; 2021:1-17.
 33. Kobe MJ, Neau DB, Mitchell CE, Bartlett SG, Newcomer ME. The structure of human 15-lipoxygenase-2 with a substrate mimic. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(12): 8562–8569
 34. Dutta M, Tareq AM, Rakib A, Mahmud S, Sami SA, Mallick J, Islam MN, Majumder M, Uddin MZ, Alsubaie A, et al. Phytochemicals from *Leucas zeylanica* targeting main protease of SARS-CoV-2: chemical profiles, molecular docking, and molecular dynamics simulations. *Biology*. 2021; 10(789): 1-19.
 35. Liu K, Watanabe E, Kokubo H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. *J Comput Aided Mol Des*. 2017; 31: 201-211.
 36. Dash R, Ali MC, Dash N, Azad MAK, Hosen SMZ, Hannan MA, Moon IS. Structural and dynamic characterizations highlight the deleterious role of SULT1A1 R213H polymorphism in substrate binding. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20(6256): 1-22
 37. Ali SA, Hassan MD, Islam A, Ahmad F. A review of methods available to estimate solvent-accessible surface areas of soluble proteins in the folded and unfolded states. *Current Protein and Peptide Science*. 2014; 15(3): 1-21.
 38. Biswas S, Mahmud S, Mita MA, Afrose S, Hasan MR, Shimu MSS, Saleh MA, Mostafa-Hedeab G, Alqarni A, Obaidullah AJ et al. Molecular docking and dynamics studies to explore effective inhibitory peptides against the spike receptor binding domain of SARS-CoV-2. *Front. Mol. Biosci*. 2012; 8(791642): 1-10.