

STUDI *IN SILICO* SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle* L) SEBAGAI INHIBITOR ENZIM MAIN PROTEASE (Mpro) PADA SARS-CoV-2

***IN SILICO* STUDY OF SECONDARY METABOLIC COMPOUNDS OF GREEN BETAL LEAVES (*Piper betle* L) AS MAIN PROTEASE ENZYME INHIBITORS (Mpro) IN SARS-CoV-2**

Akhmad Parhan Naja¹, Andika^{1*}, Mi'rajunnisa¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Banjarmasin
Jl. Gubernur Sarkawi, Handil Bakti, Kalimantan Selatan.

*Email Corresponding : andika@umbjm.ac.id

Submitted: 24 March 2022 Reviewed : 20 April 2022 Accepted: 20 June 2022

ABSTRAK

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) adalah virus penyebab COVID-19. Salah satu target potensial untuk pengobatan SARS-CoV-2 ialah *Main protease* (Mpro). Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) adalah tanaman yang terbukti secara ilmiah mempunyai efek sebagai antibakteri dan antivirus. Bagian dari tanaman sirih (*Piper betle* L.) seperti akar, biji, dan daun bermanfaat untuk pengobatan, tetapi yang paling umum digunakan adalah bagian daun. Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui potensi dan interaksi senyawa metabolit sekunder daun sirih hijau sebagai antivirus penghambat Mpro pada SARS-CoV-2 dengan protein ID: 5R84 menggunakan uji penambatan molekul. Pengujian ini meliputi penambatan molekul, pengujian Lipinski dan prediksi ADMET. Metode yang digunakan berbasis *oriented docking* dengan kompleks protein ligand dibuat *semi flexible docking* menggunakan software Autodock4. Hasil secara keseluruhan diperoleh dua puluh lima senyawa uji dari metabolit sekunder daun sirih hijau berpotensi sebagai penghambat Mpro dan senyawa uji yang mempunyai nilai *energi binding* (energi ikat bebas (ΔG)) terbaik yang berasal dari *Piperine* sebesar - 8,27 kcal/mol, disusul oleh *Piperlonguminine* sebesar -8,07 kcal/mol serta *Kaempferol* - 7,95 kcal/mol. *Piperine* sendiri diprediksi memiliki absorpsi yang bagus, distribusi pada VDss tinggi, tetapi bukan substrat dan inhibitor dari CYP 450, memiliki total klerens yang tinggi, berpotensi menimbulkan iritasi pada kulit dan toksik pada uji protozoa *T.pyriformis*. Residu asam amino HIS 41, MET 49, PHE 140, HIS 163, MET 165, GLU 166, ASN 142, ARG 188, dan GLN 189 banyak berkontribusi terbentuk ikatan hydrogen.

Kata kunci : Studi *In Silico*, Autodock4, *Piper batle* L, Antivirus, *Inhibitor* Mpro

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the virus that causes COVID-19. One of the potential target candidates of SAR-CoV-2 is *Main protease* (Mpro). Green betel leaf (*Piper betle* L.) is a plant that has been scientifically proven as antibacterial and antiviral activity. Parts of the betel plant (*Piper betle* L.) such as roots, seeds, and leaves have the potential for treatment, but the leaves are the most commonly

used. The purpose of this study was to determine the potential and interaction of secondary metabolites of green betel leaf as an antiviral inhibitor of Mpro on SARS-CoV-2 with protein ID: 5R84 using a molecular anchoring test. These tests include molecular anchoring, Lipinski testing and ADMET prediction. The method used is based on oriented docking with protein ligand complexes made semi flexible docking using Autodock4 software. The overall results obtained that twenty-five test compounds from secondary metabolites of green betel leaf have the potential as Mpro inhibitors and several test compounds of which have the best docking value (free binding energy (ΔG)) derived from Piperine of -8.27 kcal/mol, followed by Piperlonguminine is -8.07 kcal/mol and Kaempferol is -7.95 kcal/mol. Piperine itself is predicted to have good absorption, distribution at high VDss, but is not a substrate and inhibitor of CYP 450, has a high total clearance, potentially irritating to the skin and toxic to *T.pyriformis* protozoan tests. The amino acid residues HIS 41, MET 49, PHE 140, HIS 163, MET 165, GLU 166, ASN 142, ARG 188, and GLN 189 contributed to the formation of hydrogen bonds

Keywords: *In Silico*, Autodock4, Piper betle L, Antiviral, Inhibitor Mpro

PENDAHULUAN

Menurut [World Health Organization \(2020\)](#), Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) adalah infeksi yang tak tertahankan yang disebabkan oleh virus yang baru ditemukan. Banyak orang yang terinfeksi virus corona mengalami penyakit pernapasan ringan hingga sedang dan sembuh tanpa memerlukan terapi khusus. Orang tua dan individu dengan penyakit penyerta seperti infeksi kardiovaskular, diabetes, penyakit pernapasan terus-menerus, dan penyakit kanker lebih berpotensi untuk terinfeksi *coronavirus*.

Penyakit Coronavirus 2019 (COVID-19) adalah penyakit yang disebabkan oleh jenis baru coronavirus. "CO" berasal dari corona, virus "VI", penyakit "D" (*disease*). Penyakit itu disebut "2019 novel coronavirus" atau "2019- nCoV." Virus COVID-19 adalah virus baru yang terkait dengan keluarga virus yang sama dengan (SARS) dan merupakan virus flu biasa dari beberapa jenis ([L'UNICEF, 2020](#)). Menurut [Sun et al., \(2020\)](#), COVID-19 adalah infeksi *coronavirus zoonosis* ketiga yang paling dikenal setelah SARS dan *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS). Menurut [Di Gennaro et al., \(2020\)](#), COVID-19 adalah virus RNA yang memiliki penampakan koroner di bawah mikroskop elektron karena adanya paku glikoprotein di dalam amplop.

Pada manusia, COVID-19 menyerang sel-sel yang melapisi saluran udara, terutama *alveolus*. COVID19 memiliki *glikoprotein* dalam paku yang dibungkus atau protein S. Untuk dapat menginfeksi "manusia", protein S virus berikatan dengan reseptor ACE 2 pada membran plasma sel manusia. Di dalam sel, virus mereplikasi genetika dan protein yang diperlukan, menghasilkan *virion* baru di permukaan sel ([Zhang et al., 2020](#)). Mirip dengan SARS-CoV, setelah menyerang sel, melepaskan genom RNA ke dalam sitoplasma dan menerjemahkan sel Golgi menjadi dua lipoprotein dan protein struktural yang dapat direplikasi ([De Wit et al., 2016](#)).

Protease utama (Mpro) adalah komponen utama yang membentuk sifat-sifat virus corona (SARS-CoV dan SARS-CoV-2). Kemajuan teknologi telah membuka peluang untuk menemukan kandidat molekul inhibitor baru yang dapat mencegah dan mengendalikan infeksi COVID-19 dengan menghambat Mpro SARS-CoV-2. Protease utama (Mpro) adalah salah satu komponen penting virus corona. Fungsi utama Mpro adalah melepaskan polipeptida fungsional dari poliprotein melalui proses proteolitik ([Jin et al., 2020](#)). Hampir semua protein dalam virus merupakan protein target potensial untuk obat COVID-19. Mpro menjadi salah satu protein yang penting untuk target pengobatan ([Prajapat et al., 2020](#)).

Obat tradisional banyak berasal dari tumbuhan. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) merupakan tanaman yang terbukti secara ilmiah memiliki efek sebagai antibakteri dan antivirus. Bagian dari tumbuhan sirih (*Piper betle* L.) terutama akar, biji, dan daun berpotensi sebagai pengobatan, tetapi yang paling sering digunakan adalah bagian daun.

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki berbagai efek dermatologis seperti anti-bakteri, anti-jamur, antivirus, antikanker, radikal bebas pemulungan, luka bakar dan penyembuhan luka, penerangan kulit dan pelindung kulit, anti penuaan (Soni, Sharma and Malik, 2020). Senyawa piperitol, euganol, dan chavibetol ialah salah satu dari senyawa metabolit sekunder yang ada dalam daun sirih hijau yang dimana menurut penelitian yang dilakukan oleh Farabi *et al.*, (2020) membuktikan bahwa senyawa piperitol, euganol, dan chavibetol dapat menjadi senyawa yang berfungsi sebagai inhibitor dari *Main Protease* (Mpro). Cara yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi potensial aktivitas antivirus pada senyawa metabolit sekunder dalam daun sirih hijau yaitu pemanfaatan metode penambatan molekuler atau biasa disebut *Molecular docking*.

Penambatan molekuler atau *molecular docking* adalah salah satu teknik yang paling umum digunakan di SBDD karena kemampuannya memprediksi dengan tingkat keakuratan tinggi. Metodologi komputasi *molecular docking* dapat mempersingkat proses penemuan obat dengan mengurangi biaya dan sumber daya yang diperlukan melalui identifikasi *in silico* dari calon obat yang potensial (Cuzzolin *et al.*, 2015). *Molecular docking* lebih fokus mempelajari tentang bagaimana dua atau lebih struktur molekul (misalnya obat dan enzim atau protein) cocok bersama. Dalam definisi sederhana, *docking* adalah teknik pemodelan molekul yang digunakan dalam memprediksi bagaimana protein (enzim) berinteraksi dengan molekul kecil (ligan). Kemampuan protein (enzim) dan asam nukleat untuk berinteraksi dengan molekul kecil membentuk kompleks supramolekul memainkan peran utama dalam dinamika protein, yang dapat meningkatkan atau menghambat fungsi biologisnya. Metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi posisi ligan yang benar dalam kantong pengikat protein juga bisa memprediksi afinitas antara ligan dan protein (Roy *et al.*, 2015).

Berdasarkan potensi dari protease utama (Mpro) sebagai target pengobatan COVID-19, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi dan interaksi senyawa metabolit sekunder daun sirih hijau sebagai antivirus penghambat Mpro pada SARS-CoV-2 dengan protein ID: 5R84 menggunakan uji penambatan molekuler. Dari studi ini diharapkan mendapat suatu derivat baru yang dapat disintesis dan lebih lanjut dikembangkan menjadi obat COVID-19.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Perangkat keras berupa laptop ACER NITRO 5 AN515-57-58U2 dengan spesifikasi RAM (Random Access Memory) 8 gigabyte single chanel, dan SSD NVME (Solid State Drive Non-Volatile Memory Express) 512 gigabyte. Prosesor Intel® Core™ i5-11400H, CPU (Central Processing Unit) @4,5 MAX GHz (6 core 12 threads), Graphic Card NVIDIA GeForce RTX™ 3050, sistem operasi Microsoft® Windows® 10 (Amerika). Laptop terhubung dengan jaringan internet. Perangkat Lunak berupa sistem Operasi Windows 10 pro 64-bit, Discovery Studio Visualizer®, AutoDock Tools® 1.5.6 (The Scripps Research Institute, Amerika), Autodock 4.2.6, PyMOL®, UCSF Chimera®, Open Babel®, Marvin Sketch® (ChemAxon), Notepad++ serta situs Bank Data Protein, situs PubChem, situs SCFBio dan situs PcKSM. Bahan yang digunakan berupa Struktur tiga dimensi enzim *Main Protease* (Mpro) diunduh dari Bank Data Protein (<https://www.rcsb.org/>) dengan protein ID: 5R84, dan struktur ligan yang digunakan adalah senyawa native *ligand*, Lopinavir dan senyawa metabolid sekunder dalam daun *Piper betle* L yang diunduh dari situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format (.sdf).

Jalannya Penelitian

Jalannya penelitian ini dibagi menjadi beberapa langkah yaitu preparasi dari protein dan ligand, validasi metode, penambatan molekuler, identifikasi dan visualisasi interaksi, kemudian terakhir melakukan prediksi dari ADMET

1. Preparasi protein ligan

Preparasi protein kristalisasi dilakukan untuk memisahkan reseptor dan native ligand sekaligus dilakukan juga penghapusan molekul air serta penambahan atom

hidrogen polar dengan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Selanjutnya pada senyawa uji, pembandingan dan native ligand ditambahkan atom hidrogen polar dan dilakukan proses minimisasi dengan menggunakan aplikasi Chem3D dengan parameter MM2. Adapun untuk reseptor atau protein diminimisasi menggunakan aplikasi Swiss PDB Viewer dengan parameter GORMOS96.

2. Validasi metode

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menambatkan kembali (*redocking*) native ligand pada protein target menggunakan program AutoDock Tools 4.2.6 Setting grid box sangat diperlukan pada tahap ini dengan tujuan untuk mengetahui sisi aktif dari reseptor yang kemudian dapat digunakan sebagai acuan ketika melakukan penambatan pada senyawa uji.

3. Penambatan molekuler

Senyawa uji yang telah dilakukan minimisasi energi kemudian ditambatkan pada reseptornya yaitu *main protease* dengan protein ID: 5R84 menggunakan program AutoDock Tools 4.2. Luaran hasil dari dilakukannya penambatan adalah berupa nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi.

4. Identifikasi dan visualisasi interaksi

Identifikasi interaksi ikatan hidrogen ligan-reseptor yang telah diisolasi dari konformasi terbaik secara dua dimensi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* sedangkan untuk visualisasi secara tiga dimensi menggunakan aplikasi PyMOL.

5. Prediksi ADMET

Prediksi atau screening ADMET menggunakan situs PkCSM. Untuk melakukan uji ADMET pada PkCSM sebelumnya, format senyawa uji terlebih dahulu harus dikonversi ke dalam bentuk SMILES menggunakan aplikasi Open Babel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambatan molekuler (*molecular docking*) merupakan teknik *in silico* yang dapat memprediksi model interaksi antara ligand kecil (senyawa) dengan protein target di area pengikatan yang stabil. Interaksi tersebut akan menunjukkan seberapa besar afinitas atau kemampuan suatu senyawa mengikat ke kantong protein yang ditunjukkan oleh energi bebas ikatan (*binding energy*) (Iheagwam *et al.*, 2019). Sebelum melakukan penambatan molekuler perlu dilakukan proses preparasi.

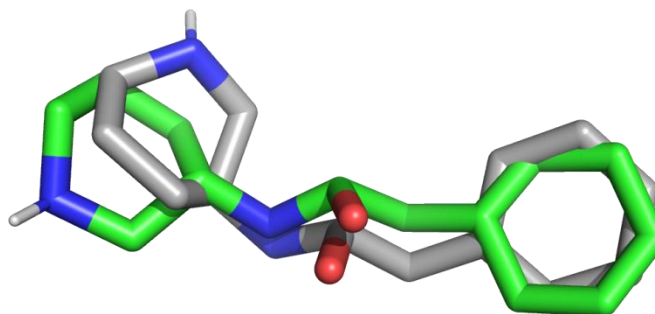
Kompleks protein-ligand Mpro dengan kode ID: 5R84 yang telah di unduh pada situs PDB, akan dilakukan preparasi awal dengan menghapus molekul air. Pada dasarnya struktur protein dalam PDB mengandung partikel pelarut berupa air serta residu lainnya. Molekul air harus dihilangkan agar tidak mengganggu proses penambatan dan interaksi yang terbentuk, sehingga yang benar-benar berinteraksi hanya protein-ligand. (Lipinski, 2016; Dermawan, Sumirtanurdin and Dewantisari, 2019). Selain dilakukan eliminasi molekul air, dalam proses preparasi juga dilakukan penambahan atom hidrogen polar pada protein target. Penambahan atom hidrogen polar ini dilakukan karena saat proses isolasi kompleks protein ligand terutama menggunakan metode difraksi kristalografi sinar-X akan ada beberapa atom hidrogen yang hilang. (Yusuf *et al.*, 2018; Hertadi, 2020). Pemisahan native ligand atau ligan referensi dari struktur protein menggunakan *Discovery Studio Visualizer*, maka akan diperoleh hasil akhir berupa struktur protein Mpro saja tanpa native ligand. Protein Mpro dengan ID: 5R84 hanya memiliki satu rantai yaitu rantai A sehingga pada proses pemisahan tidak perlu membuang rantai yang lain. Pemilihan rantai dilakukan dengan tujuan agar pemilihan sisi aktif dari protein target menjadi lebih fokus pada satu rantai saja.

Tahap selanjutnya dilakukan minimisasi energi pada protein dan ligand. Senyawa uji, senyawa pembandingan Lopinavir dan native ligand GWS 1001 akan dilakukan minimisasi energi menggunakan *software* Chem3D. penggunaan *software* Chem3D dengan penambahan muatan parsial berbasis medan gaya yaitu parameter *Molecular Mechanics* (MM2) dapat digunakan untuk pengoptimal energi mencakup unsur-unsur yang biasa

digunakan dalam senyawa organik (karbon, hidrogen, nitrogen, oksigen, belerang, dan halogen) dan molekul mirip obat (Allinger *et al.*, 1991). Minimisasi energi pada protein menggunakan *software* Swiss PDB Viewer dengan menggunakan parameter medan gaya atau *force field* GROMOS 43B1, Medan gaya ini memungkinkan evaluasi energi dari suatu struktur serta memperbaiki geometri melalui minimisasi energi (Prasad *et al.*, 2013).

Sebelum simulasi terlebih dahulu dilakukan validasi metode sebagai pengujian akurasi metode *docking* (Silva *et al.*, 2017). Hal penting dan utama yang harus dilakukan saat validasi metode *molecular docking* adalah pengaturan *grid box*. *Grid box* dibuat untuk menunjukkan ruangan dimana akan terjadi interaksi antara ligand dengan asam amino pada protein target sehingga menghasilkan efek farmakologis (Susanti *et al.*, 2019). Pada penelitian ini digunakan ukuran *grid box* dan koordinat yang diperoleh saat validasi metode yaitu ukuran 40 x 30 x 30 Å dengan *space* 0,375 Å serta titik koordinat sebagai berikut x = 10,276, y = 0,129, z = 20,352. Hasil *grid box* dan koordinat yang diperoleh pada saat validasi kemudian dipakai pada saat penambatan molekuler senyawa uji.

Nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) merupakan parameter dalam validasi *molecular docking*. Nilai RMSD menunjukkan perbandingan konformasi ligan asli dengan *redocking* dan konformasi ligan asli dengan pengukuran kristalografi (Saputri *et al.*, 2016). Hasil validasi dikatakan memenuhi syarat jika nilai RMSD < 2,0 Å (Yanuar, 2012).



Gambar 1. Hasil visualisasi overlapping antara ligan *native* warna abu-abu (co-crystal) dan yang berwarna hijau (hasil re-docking) dengan RMSD sebesar 1.69 Å

Nilai validasi metode yang diperoleh berdasarkan proses penambatan molekul native ligan terhadap protein kode ID: 5R84 yaitu sebesar 1,69 Å. Nilai tersebut ≤ 2 Å yang artinya letak posisi native ligan *co-crystal* dengan ligan *re-docking* GWS 1001 tidak terlalu berjauhan dan konformasinya sangat mirip. Nilai RMSD *re-docking* tersebut telah memenuhi standar validasi dengan itu metode ini dapat digunakan untuk penambatan molekul senyawa uji lainnya.

1. Energi bebas ikatan atau energi *binding* (ΔG) dan konstanta inhibisi (KI)

Hasil *docking* yang bagus diantaranya dapat dianalisis dengan melihat nilai binding energi atau energi bebas ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (KI). Nilai energi bebas ikatan (ΔG) terendah (nilainya semakin negatif) menunjukkan tingkat kestabilan ikatan ligan dan reseptor yang baik, sehingga ikatan yang terbentuk semakin kuat dan aktivitas penghambatannya maksimal (Abdillah, Ilmah and Mahardhika, 2017). Hasil dari penambatan molekul dari 25 senyawa metabolit sekunder dalam daun sirih hijau. Senyawa pembanding Lopinavir dan ligan *native* GWS 1001 pada protein 5R84 sebagaimana ditunjukkan pada Tabel I.

Data penambatan molekul pada protein ID: 5R84 pada Tabel I di dapat data hasil *docking* terbaik yaitu senyawa pembanding lopinavir dengan nilai energi ikatan bebas (ΔG) sebesar - 10,30 kcal/mol dan konstanta inhibisinya 28,02 nM (nanomolar), lalu native ligan GWS 1001 nilai energi ikatan bebas (ΔG) sebesar -8,41 kcal/mol dan konstanta inhibisinya

688,22 nM (nanomolar). Senyawa uji dengan nilai *docking* paling rendah yaitu senyawa terpineol-4 dengan nilai energi ikatan bebas (ΔG) sebesar - 5,23 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 147,62 uM (*micromolar*). Sedangkan hasil *docking* senyawa uji terbaik diduduki oleh senyawa piperine dengan $\Delta G = - 8,27$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 865,40 nM (nanomolar), kemudian disusul oleh senyawa uji piperlonguminine $\Delta G = - 8,07$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 1,22 uM (*micromolar*), serta kaempferol $\Delta G = - 7,95$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 1,49 uM (*micromolar*).

Tabel I. Nilai energi *binding* dan konstanta inhibisi dari penambatan molekuler pada protein 6M2N

No	Senyawa	Energi Binding	Konstanta Inhibisi
1	GWS 1001	-8,41 kcal/mol	688,22 nM (nanomolar)
2	Lopinavir	-10,30 kcal/mol	28,02 nM (nanomolar)
3	Piperine	-8,27 kcal/mol	865,40 nM (nanomolar)
4	Piperlonguminine	-8,07 kcal/mol	1,22 uM (<i>micromolar</i>)
5	Kaempferol	-7,95 kcal/mol	1,49 uM (<i>micromolar</i>)
6	Quercetin	-7,60 kcal/mol	2,68 uM (<i>micromolar</i>)
7	Myricetin	-7,20 kcal/mol	5,28 uM (<i>micromolar</i>)
8	Alpha-Cadinene	-7,05 kcal/mol	6,85 uM (<i>micromolar</i>)
9	Germacerene-D	-7,02 kcal/mol	7,21 uM (<i>micromolar</i>)
10	Beta-selinene	-6,85 kcal/mol	9,55 uM (<i>micromolar</i>)
11	Globulol	-6,81 kcal/mol	10,23 uM (<i>micromolar</i>)
12	Beta-elemene	-6,55 kcal/mol	15,87 uM (<i>micromolar</i>)
13	Aromadendrene	-6,46 kcal/mol	18,38 uM (<i>micromolar</i>)
14	Spathulenol	-6,26 kcal/mol	25,73 uM (<i>micromolar</i>)
15	Germacerene-B	-6,13 kcal/mol	32,13 uM (<i>micromolar</i>)
16	Allylpyrocatechol Diacetate	-6,10 kcal/mol	33,74 uM (<i>micromolar</i>)
17	Alpha-humulene	-6,10 kcal/mol	33,65 uM (<i>micromolar</i>)
18	Eugenyl Acetate	-5,99 kcal/mol	40,37 uM (<i>micromolar</i>)
19	Caryophyllene	-5,98 kcal/mol	41,60 uM (<i>micromolar</i>)
20	1,8-cineol	-5,88 kcal/mol	49,19 uM (<i>micromolar</i>)
21	Alpha-Pinene	-5,73 kcal/mol	63,15 uM (<i>micromolar</i>)
22	Hydroxychavicol	-5,55 kcal/mol	85,04 uM (<i>micromolar</i>)
23	Piperitol	-5,52 kcal/mol	89,44 uM (<i>micromolar</i>)
24	Cis-sabinene	-5,31 kcal/mol	128,38 uM (<i>micromolar</i>)
25	Sabinene	-5,31 kcal/mol	128,39 uM (<i>micromolar</i>)
26	Eugenol	-5,24 kcal/mol	144,80 uM (<i>micromolar</i>)
27	Terpineol-4	-5,23 kcal/mol	147,62 uM (<i>micromolar</i>)

Dari data tersebut senyawa uji piperine memiliki afinitas tertinggi atau memiliki kekuatan yang lebih besar untuk berikatan pada protein sehingga menghasilkan aktivitas biologis obat berupa penghambatan Mpro yang lebih kuat. Dalam kata lain, senyawa uji piperine memiliki potensi kemampuan menghambat Mpro lebih besar dibandingkan dengan senyawa uji lainnya. Kemampuan hambat senyawa uji piperine lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa uji piperlonguminine dan kaempferol. Nilai konstanta inhibisi juga dapat dijadikan acuan atau pembandingan dalam melakukan uji *in vitro* (IC₅₀).

2. Interaksi residu asam amino

Pada penelitian kali ini interaksi yang di tampilkan adalah *conventional hydrogen bond* (ikatan hidrogen konvensional) dan *carbon hydrogen bond* (ikatan hidrogen karbon). Ikatan hidrogen adalah ikatan non-kovalen yang paling kuat namun ikatan hidrogen lebih rapuh dari pada ikatan ion atau ikatan kovalen, dengan cara ini ikatan hidrogen adalah yang paling banyak digunakan dalam menciptakan tindakan farmakologis, jadi penting untuk

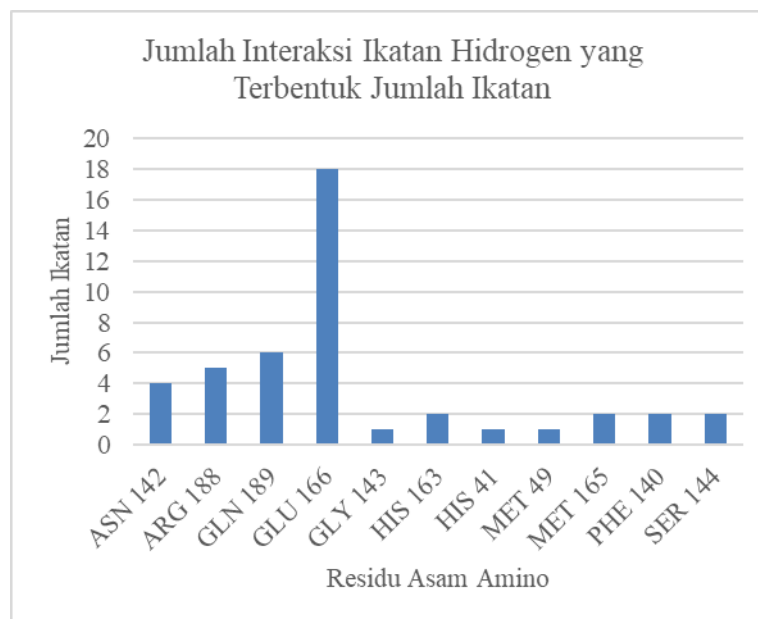
menganalisis ikatan hidrogen yang terjadi, berikut adalah hasil dari analisis interaksi residu asam amino pembentuk ikatan hidrogen sebagaimana terdapat pada [Tabel II](#).

Tabel II. Data Interaksi Residu Asam Amino Pembentuk Ikatan Hidrogen

No	Senyawa	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Jumlah
1	GWS 1001	GLU 166 (1,84 Å), GLU 166 (2,14 Å).	PHE 140 (2,81 Å).	3
2	Lopinavir	ASN 142 (2,82 Å), ASN 142 (3,08 Å), GLN 189 (2,05 Å), GLU 166 (1,98 Å), PHE 140 (2,43 Å).	-	5
3	Piperine	GLU 166 (3,23 Å).	-	1
4	Piperlonguminine	GLU 166 (2,25 Å), GLU 166 (2,47 Å).	-	2
5	Kaempferol	GLU 166 (1,99 Å), GLU 166 (2,20 Å), HIS 163 (1,90 Å), SER 144 (3,03 Å).	-	4
6	Quercetin	GLU 166 (2,18 Å), GLY 143 (1,72 Å), MET 49 (2,18 Å).	ASN 142 (3,41 Å)	4
7	Myricetin	ARG 188 (1,93 Å), ARG 188 (2,08 Å), GLU 166 (1,74 Å), GLU 166 (1,85 Å), GLU 166 (2,37 Å), HIS 163 (1,91 Å), MET 165 (2,50 Å), SER 144 (2,57 Å)	ASN 142 (3,80 Å), GLN 189 (3,17 Å)	10
8	Alpha-Cadinene	-	-	0
9	Germacerene-D	-	-	0
10	Beta-selinene	-	-	0
11	Globulol	GLU 166 (1,72 Å), GLU 166 (1,89 Å).	-	2
12	Beta-elemene	-	-	-
13	Aromadendrene	-	-	-
14	Spathulenol	GLU 166 (1,95 Å)	-	1
15	Germacerene-B	-	-	-
16	Allylpyrocatechol Diacetate	ARG 188 (2,55 Å), GLN 189 (2,13 Å), GLN 189 (2,48 Å), GLU 166 (2,02 Å), MET 165 (2,96 Å)	-	5
17	Alpha-humulene	-	-	0
18	Eugenyl Acetate	GLN 189 (1,98 Å), GLU 166 (1,89 Å)	-	2
19	Caryophyllene	-	-	0
20	1,8-cineol	-	-	0
21	Alpha-Pinene	-	-	0
22	Hydroxychavicol	HIS 41 (2,65 Å)	-	1
23	Piperitol	ARG 188 (1,97 Å), MET 165 (2,78 Å)	-	2
24	Cis-sabinene	-	-	0
25	Sabinene	-	-	0
26	Eugenol	GLU 166 (2,17 Å)	-	1
27	Terpineol-4	ARG 188 (2,11 Å)	-	1

Berdasarkan [Gambar 2](#). Diagram jumlah ikatan hydrogen terdapat 11 asam amino pembentuk ikatan hidrogen. *Glutamic acid* (GLU) 166 merupakan asam amino yang paling banyak berkontribusi membentuk ikatan hidrogen antara ligand dan protein ID: 5R84 yaitu sejumlah 18 interaksi, disusul oleh *Glutamin* (GLN) 189 sebanyak 6 interaksi dan *Arginin* (ARG) 188 sebanyak 5 interaksi.

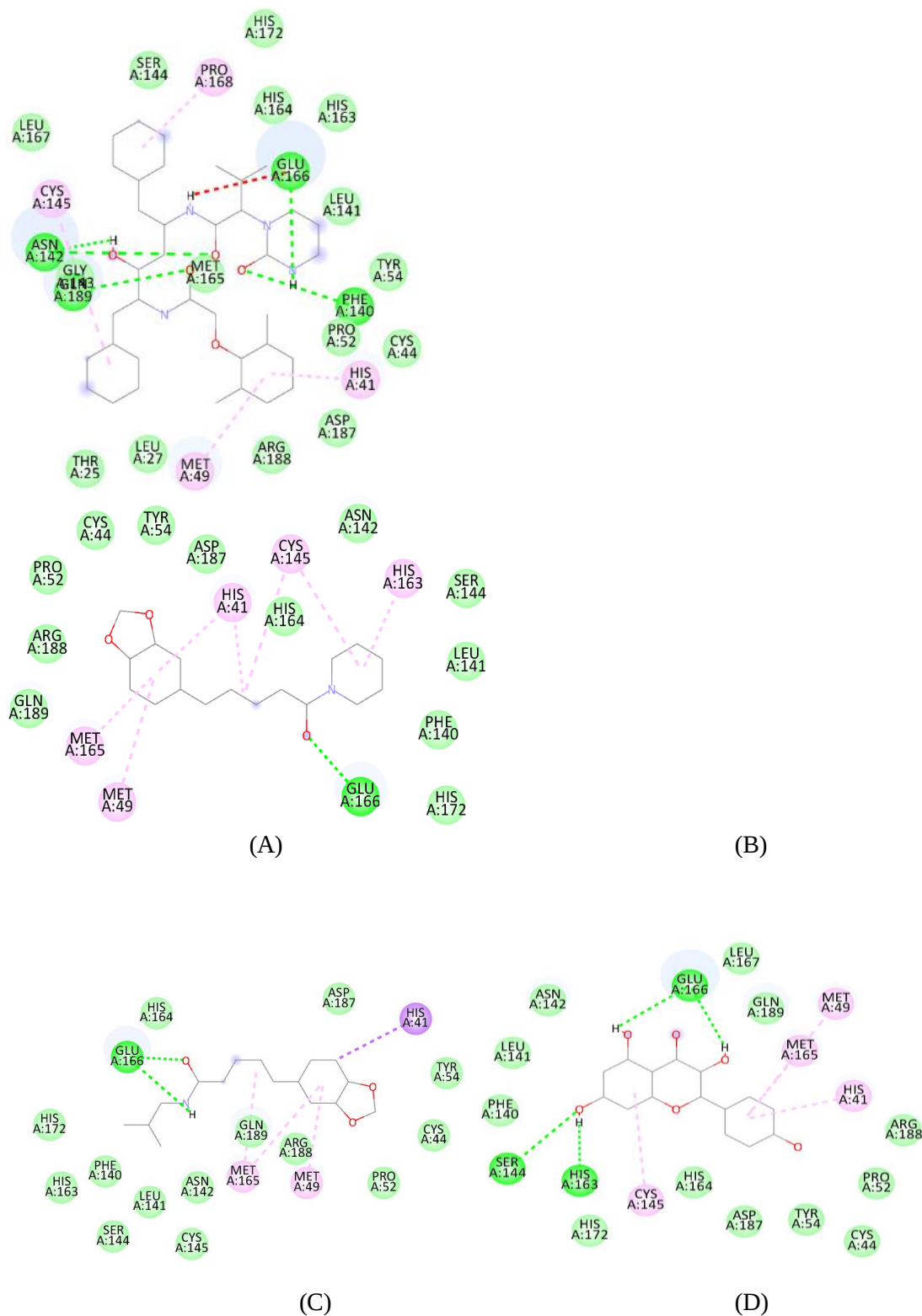
Berdasarkan penelitian [Ariyati et al., \(2020\)](#) terhadap aktivitas penghambatan daun kelor terhadap Mpro pada SARS-Cov-2. Hasil menunjukan native ligand membentuk ikatan hidrogen antara HIS 41, MET 49, PHE 140, CYS 145, HIS 163, MET 165, dan GLU 166. Senyawa-senyawa uji banyak membentuk ikatan hidrogen pada CYS 145 dan GLU 166.



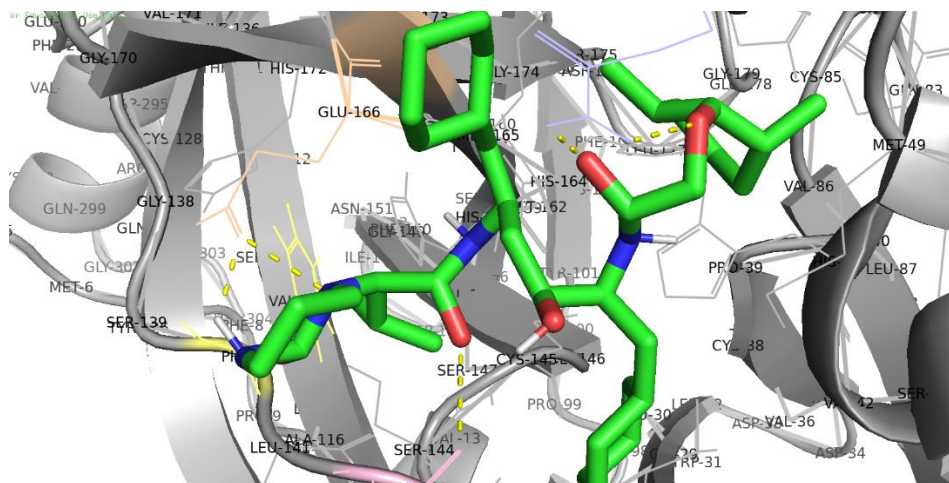
Gambar 2. Diagram jumlah ikatan hydrogen

Menurut penelitian [Pratama., et al \(2021\)](#) terhadap aktivitas penghambatan senyawa flavonoid daun jambu biji terhadap protease utama (Mpro) menunjukkan bawah tiga asam amino yang paling banyak membentuk ikatan hydrogen yaitu GLU 166 sebanyak 37 interaksi, LEU 141 sebanyak 25 interaksi dan CYS 145 sebanyak 18 interaksi. [Razzaghi-Asl et al., \(2021\)](#) melakukan penelitian terhadap analisis dekomposisi asam amino pada Mpro. Hasil menunjukan empat residu asam amino (ASN 142, GLU 166, ARG 188, dan GLN 189) memiliki kekuatan ikat yang kuat. Namun hasil yang paling bagus dapat dicapai dalam kasus GLU 166 yang merupakan salah satu residu dua katalitik. Perhitungan kimia kuantum mengkonfirmasi hasil *molecular dynamics* (MD) dan menunjukkan peran penting GLU 166 dalam membuat permanen ikatan hidrogen (98% dari waktu simulasi MD) dengan ZINC_252512772 (ΔE_b -31.66 kcal/mol). Perhitungan kami menunjukkan bahwa GLU 166 bertanggung jawab untuk pengikatan ketat ZINC_252512772 ke dalam situs aktif Mpro.

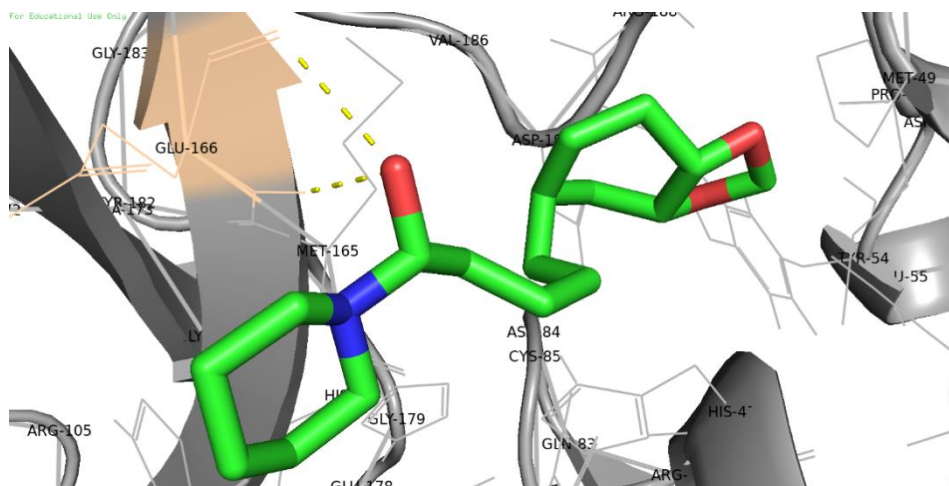
Dari beberapa penelitian di atas, asam amino yang menstabilkan dan berada pada sisi aktif protein ID: 5R84 dengan membentuk ikatan hidrogen yaitu (HIS) 41, MET 49, PHE 140, HIS 163, MET 165, GLU 166, ASN 142, ARG 188, dan GLN 189. Data tersebut mendukung hasil penelitian ini yang menyebutkan asam amino dengan jumlah interaksi ikatan hidrogen terbanyak berasal dari residu GLU 166 (18 interaksi), GLN 189 (6 interaksi) dan ARG 188 (5 interaksi). Ketiga asam amino tersebut berperan dalam terbentuknya ikatan hidrogen yang berada pada sisi aktif protein. Bahkan menurut [Razzaghi-Asl et al., \(2021\)](#) GLU 166 memiliki sifat ikatan hidrogen yang kuat sehingga menghasilkan efek penghambatan yang maksimal pada protein. Kemungkinan residu asam amino GLU 166 yang membentuk interaksi ikatan hidrogen tersebut berperan dalam kuatnya aktivitas penghambatan ligand pada enzim Mpro.



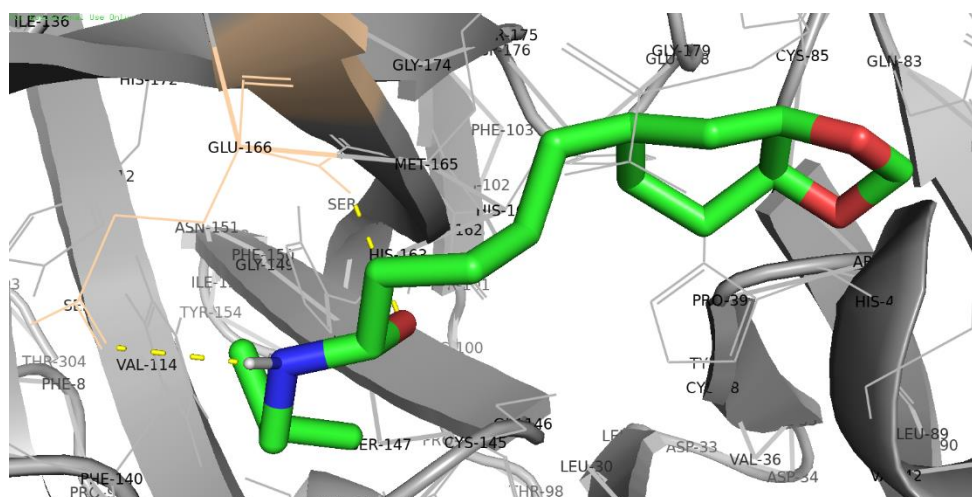
Gambar 3. Visualisasi dua dimensi menggunakan Discovery Studio Visualizer (A) Senyawa pembanding Lopinavir, (B) senyawa uji Piperine, (C) senyawa uji Piperlonguminine, (D) senyawa uji Kaempferol



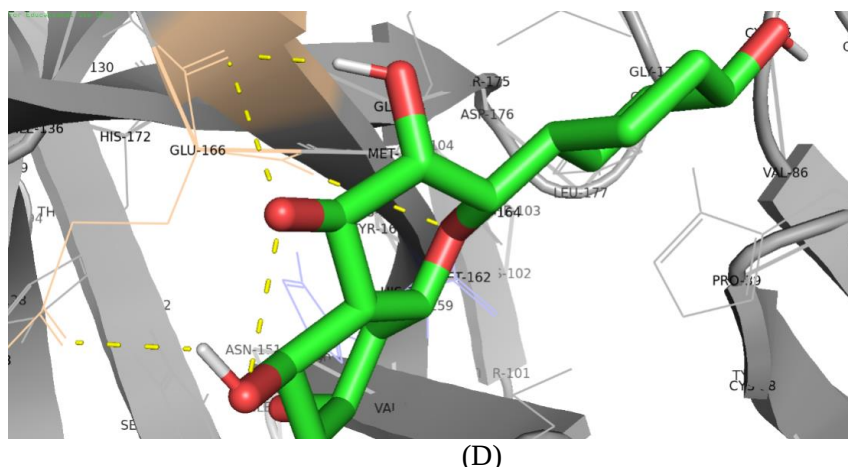
(A)



(B)



(C)



Gambar 4. Visualisasi dua dimensi menggunakan PyMOL (A) Senyawa pembanding Lopinavir, (B) senyawa uji Piperine, (C) senyawa uji Piperlonguminine, (D) senyawa uji Kaempferol

3. Hasil prediksi ADMET

Proses dalam penemuan obat baru tidak hanya melihat kekuatan ikatan ligan pada protein target, namun juga dievaluasi dari segi farmakokinetik dan toksisitas untuk menentukan tingkat efektifitas dan keberhasilan terapeutiknya. Proses farmakokinetik atau nasib obat dalam tubuh di mulai dari Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi (ADME). pkCSM merupakan situs yang menyajikan prediksi sifat ADMET pada senyawa kimia baru dengan tingkat akurasi yang tinggi.

Tabel III. Hasil prediksi ADMET

ADMET	Parameter	Senyawa Uji		
		Piperine	Piperlonguminine	Kaempferol
Absorpsi	Permeabilitas pada Caco2	Tinggi	Tinggi	Rendah
	Absorpsi pada usus manusia	Baik	Baik	Baik
	Permeabilitas pada kulit	Tinggi	Tinggi	Tinggi
Distribusi	VDss (human)	Tinggi	Tinggi	Rendah
	BBB permeability	Buruk	Buruk	Buruk
	CNS permeability	Buruk	Bagus	Buruk
Metabolisme	CYP2D6 substrat	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP3A4 substrat	Tidak	Iya	Tidak
	CYP1A2 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP2C19 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP2C9 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP2D6 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP3A4 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP2D6 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak
	CYP3A4 inhibitor	Tidak	Tidak	Tidak

Ekskresi	<i>Total Clearance</i>	1,291	1,184	1,257
	<i>Renal OCT2 substrat</i>	Tidak	Tidak	Tidak
	<i>AMES toxicity</i>	Tidak	Tidak	Tidak
	<i>Max. tolerated dose (human)</i>	-0,117	-0,021	1,642
Toksisitas	<i>hERG I inhibitor</i>	Tidak	Tidak	Tidak
	<i>hERG II inhibitor</i>	Tidak	Tidak	Tidak
	<i>Hepatotoxicity</i>	Tidak	Tidak	Tidak
	<i>Skin Sensitisation</i>	Iya	Iya	Tidak
	<i>T.Pyriiformis toxicity</i>	Toksik Rendah	Toksik Rendah	Toksik Rendah
	<i>Minnow toxicity</i>	Toksik Rendah	Toksik Rendah	Toksik Rendah

Dilihat dari data di atas 3 senyawa uji diprediksi dapat diabsorpsi dengan baik. Dan permeabilitas terutama pada kulit cukup tinggi (cocok untuk sediaan topikal rute transdermal). Dua senyawa uji diprediksi berdistribusi lebih banyak dalam jaringan. Namun, permeabilitas terhadap BBB & CNS buruk (tidak cocok ditargetkan sebagai obat BBB & CNS dimungkinkan karena lipofilisitasnya rendah). Hanya *Piperlonguminine* (substrat CYP3A4) dapat dimetabolisme oleh sitokrom utama CYP3A4, yang mana merupakan Sitokrom terbesar karena sebagian besar obat dimetabolisme oleh CYP3A4 (Ogu and Maxa, 2000). Senyawa piperine mengeluarkan laju total klerens paling besar dibandingkan kaempferol dan Piperlonguminine. 3 senyawa uji diprediksi tidak menimbulkan mutasi (uji AMES) dan tidak hepatotoksik. Tidak ada senyawa uji yang kemungkinan sebagai inhibitor *hERG* (efek samping berupa gangguan pada jantung). Hanya kaempferol yang tidak berpotensi menimbulkan iritasi pada kulit. Memiliki toksisitas terhadap protozoa, namun rendah toksisitas terhadap lingkungan dalam uji Minnow Toxicity.

KESIMPULAN

Penelitian terhadap senyawa metabolit sekunder daun sirih hijau sebagai inhibitor Mpro dengan ID: 5R84 dengan menggunakan metode penambatan molekuler diperoleh hasil energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi senyawa uji terbaik yaitu Piperine dengan $\Delta G = -8,27$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 865,40 nM (nanomolar), kemudian disusul oleh senyawa uji Piperlonguminine $\Delta G = -8,07$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 1,22 μ M (micromolar), serta Kaemferol $\Delta G = -7,95$ kcal/mol dan konstanta inhibisinya 1,49 μ M (micromolar). Nilai energi bebas ikatan yang semakin kecil menunjukkan senyawa tersebut berpotensi memiliki aktivitas biologis. Secara keseluruhan semua senyawa terutama tiga senyawa uji terbaik yaitu piperine, piperlonguminine, dan kaemferol memiliki potensi aktivitas sebagai inhibitor Mpro. Interaksi residu asam amino yang berperan dalam terbentuknya ikatan hidrogen paling banyak diperoleh dari residu asam amino *Glutamic acid* (GLU) 166 merupakan asam amino yang paling banyak berkontribusi membentuk ikatan hidrogen antara ligand dan protein ID: 5R84 yaitu sejumlah 18 interaksi, kemudian *Glutamin* (GLN) 189 sebanyak 6 interaksi dan *Arginin* (ARG) 188 sebanyak 5 interaksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, M. N., Ilmah, N. R. and Mahardhika, A. B. (2017) 'Penambatan Molekuler Senyawa Polifenolat Terhadap Enzim Reverse Transcriptase Sebagai Senyawa Antiretroviral (HIV-1)', *JSTFI Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(1), 36–4. Available at: <https://ejournal.stfi.ac.id/index.php/jstfi/article/view/59>.
- Allinger, N. L. et al. (1991) 'Molecular mechanics (MM3) calculations on aldehydes and ketones', *Journal of the American Chemical Society*, 113(12), pp. 4505–4517.
- Ariyati, M., Marsyithah, N. and Ahmad, I. (2020) 'Penambatan Molekuler Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Kelor sebagai Inhibitor Protease Utama dari SARS-CoV-2', *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, pp. 109–113. Available at: <https://doi.org/10.25026/mpc.v12i1.404>.
- Cuzzolin, A. et al. (2015) 'An integrated informatic platform bridging the gap between the robust validation of docking protocols and virtual screening simulations', *Molecules*, 20(6), pp. 9977–9993. doi: 10.3390/molecules20069977.
- Dermawan, D., Sumirtanurdin, R. and Dewantisari, D. (2019) 'Simulasi Dinamika Molekuler Reseptor Estrogen Alfa dengan Andrografolid sebagai Anti Kanker Payudara', *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 6(2), 65–76. Available at: <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/>.
- Farabi, S. et al. (2020) 'Prediction of sars-cov-2 main protease inhibitors in medicinal plant derived compounds by molecular docking approach', *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 3(Special Issue 4), pp. 76–96. doi: 10.5455/JABET.2020.D159.
- Di Gennaro, F. et al. (2020) 'Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: a narrative review', *International journal of environmental research and public health*, 17(8), p. 2690.
- Hertadi, R. (2020) 'Molecular Docking Prinsip Dan Aplikasinya dalam Skrining Virtual Kandidat Obat. Aplikasi Biokomputasi (Molecular Docking Dan DNA Storing)', *Webinar HKI Jabar Banten*, (Edisi 11). Available at: https://youtu.be/3C_hOuTYBsM.
- Iheagwam, F. N. et al. (2019) 'Potential anti-cancer flavonoids isolated from caesalpinia bonduc young twigs and leaves: Molecular docking and in silico studies', *Bioinformatics and Biology Insights*, 13, pp. 1–16. doi: 10.1177/1177932218821371.
- Jin, Z. et al. (2020) 'Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur', *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(6), pp. 529–532. doi: 10.1038/s41594-020-0440-6.
- L'UNICEF, le F. des N. (2020) 'Objectifs de développement durable'.
- Lipinski, C. A. (2016) 'Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 34–41. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.029>.
- Ogu, C. C. and Maxa, J. L. (2000) 'Drug interactions due to cytochrome P450', *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 13(1), 421. Available at: <https://doi.org/10.1080/08998280.2000.11927719>.
- Prajapat, M. et al. (2020) 'Drug targets for corona virus: A systematic review', *Indian journal of pharmacology*, 52(1), p. 56.
- Prasad, N. K. et al. (2013) 'Ligand-based pharmacophore modeling and virtual screening of RAD9 inhibitors', *Journal of Chemistry*. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/679459>.
- Pratama, R. R., Andika and Nashihah, S. (2021) 'Studi Penambatan Molekuler Senyawa Flavonoid Daun Jambu Biji (Psidium Guajava L.) Terhadap Sars-Cov-2 3cl Protease', *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 6(1), pp. 9–24. doi: 10.37874/ms.v6i1.216.

- Razzaghi-Asl, N. *et al.* (2021) 'Identification of a potential SARS-CoV2 inhibitor via molecular dynamics simulations and amino acid decomposition analysis', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), pp. 6633–6648. doi: 10.1080/07391102.2020.1797536.
- Roy, S. *et al.* (2015) 'Virtual screening, ADMET profiling, molecular docking and dynamics approaches to search for potent selective natural molecules based inhibitors against metallothionein-III to study Alzheimer's disease', *Methods*, 83, pp. 105–110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.04.021>.
- Saputri, K. E. *et al.* (2016) 'Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina', *Chimica et Natura Acta*, 4(1), 16. Available at: <https://doi.org/10.24198/cna.v4.n1.10443>.
- Silva, A. da *et al.* (2017) 'Tyrosinase Inhibitory Activity, Molecular Docking Studies and Antioxidant Potential ff Chemotypes Of Lippia Origanoides (Verbenaceae) Essential Oils', *PLoS ONE*, 263, 1–17. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175598>.
- Soni, H., Sharma, S. and Malik, J. K. (2020) 'Synergistic Propphylaxis on COVID-19 by Nature Golden Heart (Piper betle) and Swarna Bhasma', *Asian Journal of Research in Dermatological Science*, 3(2), pp. 21–27.
- Sun, P. *et al.* (2020) 'Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: a single arm meta-analysis', *Journal of medical virology*, 92(6), pp. 612–617.
- Susanti, N. M. P. *et al.* (2019) 'Molecular Docking Terpinen-4-Ol Sebagai Antiinflamasi Pada Aterosklerosis Secara In Silico', *Jurnal Kimia (Journal Of Chemistry)*, 13(2), 221. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.24843/jchem.2019.v13.i02.p16>.
- De Wit, E. *et al.* (2016) 'SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses', *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), pp. 523–534.
- World Health Organization (2020) 'Coronavirus confirmed as pandemic by World Health Organization'.
- Yanuar, A. (2012) 'Penambatan Molekular, Praktek dan Aplikasi pada Virtual Screening (1 ed.)', *Fakultas Farmasi Universitas Indonesia*.
- Yusuf, M. *et al.* (2018) 'Introduction of Docking-Based Virtual Screening Workflow Using Desktop Personal Computer', *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–12. Available at: <https://doi.org/doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20277-X>.
- Zhang, A. L., Wang, Y. and Molina, M. J. (2020) 'Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2020) 117 (14857-14863) DOI: 10.1073/pnas.2009637117)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), pp. 25942–25943. doi: 10.1073/pnas.2018637117.