

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan perancangan obat berbasis komputasi (*Computer Aided Drug Design-CADD*) menggunakan metode skrining farmakofor dan *molecular docking* terhadap senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).

Ligan pembanding yang digunakan penelitian yaitu bernomor id *Query on* 189 dengan nama senyawa N-Benzyl-2(2,6-dimethylphenoxy)-N-(((3R,4S)-4-[[isobutyl(phenylsulfonyl)amino]methyl]pyrrolidin-3-yl)methyl]acetamide yang tertambat pada reseptor *Human Immunodeficiency Virus type 1 protease* (HIV type 1 *Protease*) dengan kode PDB: 1XL2, dipilih pada bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) di dapat dari metode difraksi sinar-X beresolusi 1.50 Å yang di unduh dari *Protein Data Bank* (PDB) dan makromolekul target yang digunakan yaitu reseptor dari anti SARS-CoV-2 dengan kode PDB: 7BUY, dipilih pada bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) didapat dari metode difraksi sinar-X dengan resolusi 1.60 Å yang diunduh dari *Protein data Bank* (PDB).

Beberapa tahapan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu skrining farmakofor, *molecular docking*, prediksi *drug likeness*, dan prediksi profil farmakokinetika. Tahap skrining farmakofor dalam penelitian ini termasuk salah satu metode *Ligand Based Drug Design* (LBDD) yang tujuannya untuk menemukan kemiripan fitur farmakofor senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan struktur senyawa aktif dari ligan

pembandingan pada reseptor HIV *type 1 protease* yang dianggap memiliki aktivitas farmakologi yang sama.

Digunakan reseptor HIV *type 1 protease* sebagai ligan pembandingan, karena memiliki mekanisme kerja yang sama dengan *main protease*. HIV *type 1 protease* memiliki mekanisme kerja sebagai penghambatan replikasi virus dengan cara RNA virus diubah menjadi DNA untuk disediakan poliprotein virus kemudian polipeptida dihidrolisis menjadi protein matang oleh protease lalu dilepaskan di permukaan sel.²⁶ Sedangkan *main protease* memiliki mekanisme menghambat replikasi virus dengan cara melepaskan polipeptida fungsional dari poliprotein melalui proses proteolitik.²⁷ Selain itu, ritonavir merupakan salah satu obat yang digunakan saat ini sebagai pengobatan virus anti SARS-CoV-2 juga salah satu obat anti HIV.²⁸

Rancangan penemuan obat menggunakan metode skrining farmakofor pada tahap validasi memerlukan *database* senyawa aktif dan senyawa *decoy* (pengecoh) terhadap aktivitas *Main Protease* sebagai anti SARS-CoV-2. Namun, senyawa aktif dan senyawa *decoy* belum tersedia di DUD-E untuk *main protease*, sehingga dipilihkan *Human Immunodeficiency Virus type 1 protease* yang memang mekanismenya sama-sama menghambat replikasi virus dengan mekanisme *Main Protease* untuk anti SARS-CoV-2. Sebelum tahap validasi ini menghasilkan model farmakofor yang mampu menyeleksi dan membuktikan bahwa untuk menemukan senyawa baru yang berpotensi sudah sesuai dengan yang diperlukan.

Skrining farmakofor dilakukan terhadap ligan pembandingnya terlebih dahulu. Farmakofor yang diperoleh dari hasil skrining terhadap N-Benzyl-2 (2,6-dimethylphenoxy) -N-(((3R,4S)-4 -{[isobutyl (phenylsulfonyl)amino] methyl} pyrrolidin-3-yl)methyl)acetamide yang tertambat pada HIV *type 1 protease* terdapat enam ikatan hidrofobik, satu akseptor ikatan hidrogen, dan dua donor ikatan hidrogen (Gambar V.1). Model ini digunakan untuk mencari ligan uji yang memiliki kemiripan farmakofor dan diprediksi memiliki kesamaan aktivitas farmakologi. Setiap farmakofor yang diperoleh akan dipindahkan satu persatu ke tab *Screening Perspective*.

Dibutuhkan *database* untuk membuat model farmakofor yang di unduh dari situs online *Binding Database*. Reseptor HIV *type 1 protease* yang dipilih memiliki senyawa aktif sebanyak 66 *database*. File senyawa aktif yang telah diunduh dimasukkan ke *ligand based perspective* pada program aplikasi *LigandScout*[®], lalu senyawa aktif dibuat *general* dan dibentuk *cluster* untuk dikelompokkan sesuai variasi struktur. Pada *cluster* diurutkan dari nilai terkecil ke nilai terbesar dan setiap *cluster* ini dibuat *ignore type*, serta salah satunya dipilih menjadi senyawa *training type* yang gunanya untuk meringankan kerja pada program aplikasi *LigandScout*[®]. Selanjutnya dibuat file model farmakofor dengan cara memilih simbol *create ligand base pharmacophore*, ditunggu sampai prosesnya selesai.

Tabel IV.1
Model Farmakofor Pada Tahap Metode Skrining

No.	Model	Score
1.	Model 1	0,8210
2.	Model 2	0,8168
3.	Model 3	0,8046
4.	Model 4	0,7735
5.	Model 5	0,7618
6.	Model 6	0,7523
7.	Model 7	0,7514
8.	Model 8	0,7456
9.	Model 9	0,7253
10.	Model 10	0,6565

Senyawa aktif dari HIV *type 1 protease* yang dipilih sebanyak 66 *database* tersebut membentuk model farmakofor sebanyak 10 model. (Tabel IV.1) Model 1 memiliki nilai *fit score* yang besar, semakin besar nilai maka tingkat kemiripan antara struktur farmakofor standar dan farmakofor senyawa aktif pun semakin besar. Semua model farmakofor ini di masukkan ke tab *screening perspective* untuk selanjutnya dilakukan validasi, sehingga pada tab *virtual screening perspective* terdapat satu struktur farmakofor dari reseptor HIV *type 1 protease* dan sepuluh model farmakofor.

Penelitian ini menggunakan perbandingan 1:5 pada tahap validasi *model* farmakofor yaitu dengan memilih 20 *database* senyawa aktif dan 100 *database* senyawa *decoy* yang diunduh dari situs online *DUD-E*. Senyawa harus lebih besar

dibandingkan *decoy* agar model farmakofor dapat mengidentifikasi dengan baik. Hasil validasi ini dilihat dari ROC *curve* (*Receiver Operator Characteristic*), senyawa *hits* dan hasil nilai GH *score* (*Goodness of Hit list*). Model farmakofor ini dikatakan valid jika nilai AUC dari ROC *curve* dan nilai GH *score* $\geq 0,70$ atau 70%. GH *score* ini menjadi salah satu parameter validasi gunanya untuk melihat kualitas senyawa *hits* yang dihasilkan. GH *score*nya hanya dapat dicapai dengan senyawa aktif yang tinggi dan senyawa *decoy*/ senyawa *negative* palsu yang rendah pada waktu bersamaan. Sedangkan AUC menjadi parameter validasi untuk melihat kualitas hasil dari validasi yang dilakukan. Dimana ROC *curve* ini menampilkan peningkatan positif palsu (senyawa *decoy*) yang dihasilkan dengan peningkatan positif benar (senyawa aktif).²⁹

ROC *curve* menunjukkan bahwa koordinat y pada kurva mewakili tingkat positif benar atau sensitivitas, sedangkan koordinat x menunjukkan 1-spesifisitas atau mewakili tingkat positif palsu yang sesuai. Kurva yang ideal akan naik vertikal sepanjang sumbu y sampai mencapai tingkat positif maksimum yaitu 1, dan kemudian berlanjut secara horizontal yang berarti daftar sarannya terisi semua oleh senyawa aktif dalam database dan tidak ada *hit* yang positif palsu. Jika tahapan ini sudah valid, maka dapat dilakukan ke tahap skrining senyawa uji yang berpotensi, karena penyeleksian senyawa aktif dan senyawa *decoy* telah dilakukan oleh model *pharmacophore* yang digunakan.³⁰

Tabel IV. 2
 Hasil Validasi Model Farmakofor






Reseptor	ROC Curve	AUC	GH Score
HIV type 1 protease		0,91	0,8










Hasil validasi pada penelitian ini dikatakan valid, karena model farmakofor yang telah dibuat berdasarkan ligan aktif pada ligan pembanding yang tertambat pada HIV *type 1 protease* memperoleh GH score sebesar 0,8 atau 80% dan nilai AUC pada ROC curve sebesar 0,91 atau 91% dengan senyawa aktif (TP) 17 dari 20 senyawa dan senyawa *decoy* (FP) 4 dari 100 senyawa maka total hits berjumlah 21 *hits*. Berdasarkan hasil yang didapat pada tahap validasi ini dikatakan valid karena menghasilkan $\geq 0,70$ atau 70% sehingga dapat dilakukan tahap skrining pada ligan uji. (Tabel IV.2)

Sebelum ligan uji dari senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) ini dipindahkan, ligan uji diminimalkan energinya menggunakan Chem3D Pro 12[®] untuk mencari energi terbaik sehingga ligan berada pada keadaan stabil dengan format (.pdb). Setelah itu ligan uji di buka di

program aplikasi *LiganScout 4.4.5*[®] dipindahkan ke tab *Ligand-Based Perspectives* satu persatu, disimpan semuanya dengan format (.ldb) untuk selanjutnya dilakukan pada tab *screening perspectives*. Proses skrining ligan uji penelitian ini menghasilkan 13 senyawa dari 40 senyawa yang diuji, yaitu :

Tabel IV.3
Hasil Skrining Farmakofor

No.	Nama Senyawa	Matching Features	Fit Score (%)
1.	N-Benzyl-2 (2,6-dimethylphenoxy)-N{((3R,4S)-4- {[isobutyl (phenylsulfonyl)amino] methyl}pyrrolidin-3-yl) methyl} acetamide (Ligan Pembanding)		-
2.	Quercetin		41,05
3.	Kaempferol		40,80
4.	Rubiadin		39,61
5.	Lucidin		39,52

6.	Alizarin		34,73
7.	Damnacanthal		34,47
8.	Rutin		33,98
9.	Tyrosine		33,88
10.	Isoleucine		33,41
11.	Methionine		33,35
12.	Leucine		33,03
13.	Tryptophan		33,01
14.	Morindone		32,20

Keterangan :

Warna kuning = ikatan hidrofobik

Warna merah = Akseptor ikatan hidrogen

Warna hijau = Donor ikatan hidrogen

Berdasarkan hasil virtual skrining, diperoleh hasil senyawa yang terkandung dalam mengkudu memiliki kemiripan fitur farmakofor yang bervariasi antara 32,20-41,05 terhadap ligan pembanding yang tertambat pada HIV *type 1*

protease, sehingga dapat diprediksi memiliki kemiripan aktivitas farmakologi, serta dapat dilakukan ke tahap *molecular docking*. (Tabel IV.3)

Molecular docking digunakan untuk menemukan interaksi reseptor dengan ligan. Tahapan ini termasuk metode SBDD (*Structure Based Drug Design*) yang tujuannya memprediksi sisi aktif senyawa sehingga dapat berikatan dengan protein target, menggunakan informasi dari struktur protein target untuk mencari sisi aktif protein yang berikatan dengan senyawa obat sehingga memiliki aktivitas biologis.²¹

Makromolekul target pada penelitian tahapan *molecular docking* ini menggunakan reseptor dari anti SARS-CoV-2 dengan kode PDB 7BUY, beresolusi 1.60 Å yang diunduh dari *Protein data Bank* (PDB) dan ligan yang tertambat pada reseptor ini yaitu *Hexylcarbamic acid* yang dijadikan sebagai ligan alami, menggunakan ligan pembanding dari ligan yang tertambat pada HIV *type 1 protease* yaitu ritonavir yang menjadi salah satu obat SARS-CoV-2 serta ligan uji yang digunakan yaitu senyawa yang terdapat pada mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan jumlah 40 senyawa, masing-masing senyawa tersebut akan ditambatkan pada reseptor 7BUY.

Validasi metode dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui program *Discovery Studio Visualizer*[®] dan *Autodock tools*[®] yang digunakan pada tahap *molecular docking* ini dapat menambatkan kembali ligan alami ke sisi aktif reseptor pada posisi semula atau tidak. Proses validasi dengan cara *redocking*, dilihat dari perhitungan nilai RMSD (*Root Means Square Deviation*) yang menjadi parameter untuk mengevaluasi kemiripan antara koordinat struktur hasil

redocking dengan koordinat struktur hasil kompormasi kristal. Semakin kecil nilai RMSD dari 2Å maka penambatan molekul dikatakan berhasil dan kemiripan struktur semakin tinggi, serta dapat digunakan untuk penelitian *molecular docking* pada ligan uji. ²¹

Hasil validasi *molecular docking* yaitu memiliki nilai RMSD 1,389 Å. (Tabel V.2) sehingga dapat dikatakan bahwa sistem yang digunakan sesuai dan dapat dilakukan ke tahap *molecular docking* ligan uji dari senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Hasil RMSD ini dapat dilihat pada konfigurasi file berformat (dock.dlg) dengan bantuan aplikasi *Notepad*⁺⁺®. Hasil visualisasi residu asam amino terdapat satu ikatan hidrogen penting yaitu glisin dan dua ikatan hidrofobik yaitu metionin, dan histidin. (Gambar V.4)

Setelah dilakukan preparasi ligan uji, kemudian masing-masing ligan ditambahkan menggunakan *Autodock tools*[®] ke reseptor anti SARS-CoV-2 dengan kode PDB 7BUY yang telah dipreparasi. Pada proses *molecular docking* ini menghasilkan nilai *binding affinity* dari setiap ligan. Nilainya ditentukan berdasarkan nilai ΔG (Energi bebas Gibbs), nilai KI (Konstanta Inhibisi) dan interaksi residu asam amino. Semakin rendah atau semakin negatif nilai ΔG , maka kestabilannya antara ligan dengan reseptor akan lebih baik, karena ikatannya akan semakin kuat. Begitupun nilai KI karena nilainya sejalan dengan ΔG . Sedangkan interaksi residu asam amino dilihat dari ligan uji yang berikatan paling baik, dimana ikatan tersebut sama dengan ikatan pada ligan alami. ³¹

Hasil 40 senyawa ligan uji pada penambatan ini dapat dikatakan semua memiliki afinitas baik karena nilai ΔG ligan uji lebih rendah dibandingkan dengan nilai ΔG ligan alaminya. (Tabel V.3) Namun interaksi residu asam amino pada ligan uji ini tidak semua memiliki ikatan residu asam amino penting yang sama seperti pada ligan alami dan ligan pembanding, dari 40 senyawa mengukudu hanya 24 senyawa yang memiliki ikatan hidrogen penting dengan glisin, (Tabel IV.4) yaitu :

Tabel IV.4
Hasil Molecular Docking Dengan Residu Asam Amino Penting Yang Sama

No.	Senyawa	ΔG (kkal/mol)	KI (nM)	Residu Asam Amino
	hexylcarbamic acid (ligan alami)	-2,29	$20,85 \times 10^6$	GLY143A, MET165A, HIS41A
	Ligan HIV <i>type 1</i> <i>protease</i>	-6,48	$17,76 \times 10^3$	GLY143A, CYS44A, MET49A, MET165A, CYS145
	Ligan Ritonavir	-5,48	$95,89 \times 10^3$	GLY143A, MET165A, MET49A, MET49A, ASN142, HIS41A, THR26A
1.	4-Epi-borreriagenin	-5,84	$52,37 \times 10^3$	GLY143A, HIS164A, CYS145A, GLU166A, HIS172A, HIS163A

2.	Alanine	-2,93	$7,15 \times 10^6$	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A
3.	Arginine	-3,98	$1,21 \times 10^6$	PHE140A, GLY143A, CYS145A, SER144A
4.	Asperuloside tetracetate	-7,85	$1,75 \times 10^3$	GLU166A, SER144A, GLY143A, CYS145A, SER46A, HIS41A, HIS172A, ASN142A, MET49A, MET165A
5.	Caproic acid	-3,66	$2,09 \times 10^6$	GLY143A, SER144A, CYS145A
6.	Caprylic acid	-3,90	$1,38 \times 10^6$	CYS145A, SER144A, GLY143A
7.	Cysteine	-3,36	$3,46 \times 10^6$	GLY143A, CYS145A, SER144A, HIS163A, PHE140A, ASN142A, HIS172A
8.	Damnacanthal	-6,74	$11,51 \times 10^3$	GLU166A, GLY143A,

				CYS145A, HIS41A, HIS163A
9.	Deacetyl- asperulosidic acid	-6,63	$13,70 \times 10^3$	GLN192A, ARG188A, GLN189A, GLU166A, HIS163A, ASN142A, GLY143A, MET165A, MET49A, HIS41A
10.	Ethyl caproate	-4,13	$932,78 \times 10^3$	GLY143A, SER144A, CYS145A, HIS172A, HIS163A
11.	Glutamic acid	-2,93	$7,14 \times 10^6$	CYS145A, SER144A, GLY143A, LEU141A ASN142A
12.	Hexose	-4,96	$232,64 \times 10^3$	GLU166A, GLY143A, LEU141A, SER144A, HIS163A, ASN142A, HIS172A
13.	Histidin	-4,45	551×10^3	HIS163A, SER144A, CYS145A,

				GLY143A, ASN142A
14.	Kaempferol	-7,51	$3,15 \times 10^3$	GLU166A, HIS163A, SER144A, GLY143A, THR26A, CYS145A
15.	Leucine	-4,15	$913,56 \times 10^3$	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A, PHE140A, HIS163A, HIS172A
16.	Linoleic acid	-4,78	$313,35 \times 10^3$	SER144A, GLY143A, CYS145A, HIS41A
17.	Lucidin	-6,70	$12,32 \times 10^3$	GLY143A, SER144A, GLU166A, CYS145A, HIS41A, HIS163A
18.	Methionine	-3,69	$1,97 \times 10^6$	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A, HIS163A, HIS172A
19.	Quercetin	-7,79	$1,94 \times 10^3$	GLN189A, GLU166A,

				SER144A, GLY143A, LEU141A, ASN142A, MET165A, CYS145A, HIS41A, MET49A
20.	Rubiadin	-6,95	$7,98 \times 10^3$	GLU166A, SER144A, GLY143A, CYS145A, HIS163A
21.	Rutin	-9,86	59,71	GLU166A, HIS163A, SER144A, PHE140A, CYS145A, GLY143A, HIS41A, THR25A, CYS44A, MET165A,, LEU27A
22.	Serine	-3,27	$3,98 \times 10^6$	HIS163A, CYS145A, GLY143A, SER144A, LEU141A, MET165A
23.	Tryptophan	-5,29	$133,47 \times 10^3$	ASN142A, GLY143A,

				CYS145A, SER144A, LEU141A
24.	valine	-3,73	$1,83 \times 10^6$	GLY143A, CYS145A, SER144A, ASN142A

Keterangan : warna hijau = residu asam amino penting

Kemudian dilakukan prediksi *drug likeness* berdasarkan aturan *Lipinski's Rule Of Five* pada ligan uji senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang tujuannya untuk memprediksi kemiripan obat dari senyawa kimia dengan aktivitas biologis tertentu yang dirancang untuk rute pemberian oral.²³

Aturan-aturan tersebut yaitu pertama memiliki berat molekul < 500 Da, berat molekul ini berhubungan dengan permeabilitas pada suatu ligan apabila berat molekul lebih dari 500 da maka akan terjadi penurunan permeabilitas dan ligan tidak dapat berdifusi menembus membran sel sehingga mempengaruhi distribusi obat. Kedua, memiliki $\text{Log P} < 5$ ini berhubungan dengan lipofilisitas apabila log P kurang dari 5 maka ligan tersebut bersifat hidrofilik atau senyawa tersebut memiliki afinitas yang lebih tinggi untuk fase air, namun jika sifatnya terlalu hidrofilik nilainya negatif akan sulit juga untuk menembus membran dan berikatan dengan target, sedangkan jika nilai log P lebih tinggi dari 5 maka ligan akan bersifat lipofilik atau konsentrasinya lebih tinggi pada fase lipid yang akan mempengaruhi toksisitas, dimana ligan tersebut tertahan di lipid bilayer dan tidak mencapai target kerja karena selektivitas dalam mengikatnya berkurang.

Selanjutnya jumlah donor ikatan hidrogen < 5 dan jumlah akseptor ikatan hidrogen < 10 , ikatan hidrogen donor maupun akseptor ini mempengaruhi permeabilitas membran lipid bilayer apabila nilai ikatan hidrogennya lebih tinggi maka kemampuan absorpsi semakin besar dan membutuhkan energi yang dikeluarkan pun semakin besar, nantinya akan mengganggu dan merusak permeabilitas sel.³²

Tabel IV. 5

Prediksi Drug Likeness Senyawa Yang Terkandung Dalam Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Berdasarkan aturan Lipinski's Rule of Five

Nama Senyawa	Berat Molekul (gr/mol)	Akseptor ikatan hidrogen	Donor ikatan hidrogen	Log P	Ket.
2-Pentanone	86,13	1	0	0,9	
3-Methylebutanal	86,13	1	0	1	
4-Epi-borreriagenin	214,21	5	3	-1,5	
Alanine	89,09	3	2	-3	
Alizarine	240,21	4	3	3,2	
Arginine	174,2	4	4	-4,2	
Aspartic acid	133,1	5	3	-2,8	
Asperuloside tetracetate	582,5	15	0	-0,7	
Beta-sitosterol	414,7	1	1	9,3	
Caproic acid	116,16	2	1	1,9	
Caprylic acid	144,21	2	1	3	

Cysteine	121,16	4	3	-2,5	Red
Damnacanthal	282,25	5	1	2,5	Green
Deacetylasperulosidic acid	390,34	11	7	-3,8	Red
Ethyl caproate	144,21	2	0	2,4	Red
Ethyl caprylate	172,26	2	0	3,5	Red
Glutamic acid	147,13	5	3	-3,7	Red
Hexose	180,16	6	5	-2,6	Red
Histidin	155,15	4	3	-3,2	Red
Isoleucine	131,17	3	2	-1,5	Red
Kaempferol	286,24	6	4	1,9	Green
Leucine	131,17	3	2	-1,5	Red
Linoleic acid	280,4	2	1	6,8	Red
Lucidin	270,24	5	3	2,4	Green
Methionine	149,21	4	2	-1,9	Red
Methyl decanoate	186,29	9	2	4,7	Green
Methyl octanoate	158,24	2	0	3,6	Red
Morindone	270,24	5	3	3,3	Green
Proline	112,13	3	2	-2,5	Red
Quercetin	302,23	7	5	1,5	Green
Rubiadin	254,24	4	2	3,1	Green
Rutin	610,5	16	10	-1,3	Red

Scopoetine	192,17	4	1	1,5	
Serine	105,09	4	3	-3,1	
Soranjidiol	254,24	4	2	3,1	
Threonine	119,12	4	3	-2,9	
Tryptophan	204,22	3	3	-1,1	
Tyrosine	181,19	4	3	-2,3	
Ursolic acid	456,7	3	2	7,3	
valine	117,15	3	2	-2,3	

Keterangan :

BM (Berat Molekul) = <500 Dalton

Akseptor ikatan hydrogen = <10

Donor ikatan hidrogen = <5

Log P = <5

Warna hijau = memenuhi syarat

Warna merah = tidak memenuhi syarat

Hasil dari prediksi *drug likeness* ini bahwa terdapat 2 senyawa uji yaitu asperuloside tetraacetate dan rutin yang tidak memenuhi syarat bobot molekul, 3 senyawa uji yang tidak memenuhi syarat akseptor ikatan hidrogen yaitu asperuloside tetracetate, deacetylasperulosidic acid, dan senyawa rutin, 8 senyawa yang tidak memenuhi syarat donor ikatan hidrogen dan 16 senyawa yang memenuhi syarat logP berdasarkan aturan *Lipinski's Rule of Five*. Dari keseluruhan dapat disimpulkan bahwa hanya 12 senyawa yang memenuhi persyaratan dan dapat dijadikan sediaan oral yaitu senyawa uji: alizarin, caproic acid, caprylic acid, damnacanthal, kaempferol, lucidin, methyl decanoate, morindone, quercetin, rubiadin, scopoletin, dan soranjidiol. (Tabel IV.5)

Selanjutnya dilakukan prediksi profil farmakokinetika meliputi absorpsi dan distribusi senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) menggunakan situs online *Pre-ADMET*. Pengujian ini bertujuan untuk menganalisa parameter awal farmakokinetik. Parameter yang akan dianalisis yaitu HIA (*Human Intestinal Absorbtion*), Caco-2 dan *Protein Plasma Binding*. HIA merupakan bioavaibilitas dan absorpsi yang dinilai berdasarkan rasio eksresi melalui urin, empedu, dan feses, atau kemampuan obat terabsorbsinya pada usus. Semakin tinggi nilai HIA menunjukkan absorbansinya yang lebih baik pada saluran usus setelah pemberian oral. Permeabilitas sel Caco-2 juga menunjukkan absorpsi suatu obat, dalam kemampuannya untuk mengetahui transport obat melalui epitel intestinal yang asalnya dari adenocarcinoma kolon manusia. Sedangkan *Protein Plasma Binding* menunjukkan prediksi distribusi berdasarkan keterikatan dengan protein plasma. Semakin terikat lemah senyawa dengan protein plasma maka semakin tinggi kemampuan untuk didistribusikan senyawa tersebut ke berbagai jaringan.^{33,24}

Tabel IV. 6
Hasil Prediksi Profil Farmakokinetik Senyawa Yang Terkandung Dalam Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

No.	Senyawa	Absorpsi		Distribusi
		HIA (%)	Caco2 (nm. Sec-1)	<i>Plasma Protein Binding (%)</i>
1.	2-Pentanone	100 ^a	42,48 ^b	81,08 ^b
2.	3-Methylebutanal	100 ^a	24,73 ^b	81,71 ^b
3.	4-Epi-borreriagenin	68,08 ^b	20,30 ^b	2,47 ^b

4.	Alanine	71,40 ^a	15,34 ^b	86,94 ^b
5.	Alizarin	92,34 ^a	0,36 ^c	98,05 ^a
6.	Arginine	27,90 ^b	20,96 ^b	15,35 ^b
7.	Aspartic acid	35,26 ^b	8,82 ^b	56,14 ^b
8.	Asperuloside tetracetate	51,92 ^b	15,25 ^b	37,49 ^b
9.	Beta-sitosterol	100 ^a	52,37 ^b	100 ^a
10.	Caproic acid	90,93 ^a	20,73 ^b	84,64 ^b
11.	Caprylic acid	93,72 ^a	1,22 ^c	100 ^a
12.	Cysteine	56,88 ^a	19,71 ^b	32,86 ^b
13.	Damnacanthal	96,02 ^a	14,25 ^b	88,94 ^b
14.	Deacetylasperulosidic acid	6,97 ^c	14,03 ^b	18,01 ^b
15.	Ethyl caproate	100 ^a	55,67 ^b	100 ^a
16.	Ethyl caprylate	100 ^a	43,82 ^b	100 ^a
17.	Glutamic acid	37,17 ^b	13,81 ^b	0 ^b
18.	Hexose	22,36 ^b	2,57 ^c	7,31 ^b
19.	Histidine	59,66 ^b	18,35 ^b	0 ^b
20.	Isoleucine	77,40 ^a	20,42 ^b	0 ^b
21.	Kaempferol	79,44 ^a	9,58 ^b	89,61 ^b
22.	Leucine	77,40 ^a	20,42 ^b	0 ^b
23.	Linoleic acid	98,37 ^a	28,08 ^b	100 ^a
24.	Lucidin	87,27 ^a	5,76 ^b	86,85 ^b

25.	Methionine	76,28 ^a	20,60 ^b	0 ^b
26.	Methyl decanoate	100 ^a	38,23 ^b	100 ^a
27.	Methyl octanoate	100 ^a	29,64 ^b	100 ^a
28.	Morindone	90,42 ^a	20,89 ^b	99,58 ^a
29.	Proline	78,32 ^a	20,39 ^b	83,38 ^b
30.	Quercetin	63,49 ^b	3,41 ^c	93,24 ^a
31.	Rubiadin	92,59 ^a	16,33 ^b	96,48 ^a
32.	Rutin	2,86 ^c	28,89 ^b	43,89 ^b
33.	Scopoletine	93,92 ^a	0,28 ^c	29,42 ^b
34.	Serine	50,63 ^b	6,97 ^b	78,05 ^b
35.	Soranjidiol	93,74 ^a	21,11 ^b	100 ^a
36.	Threonine	52,07 ^b	9,94 ^b	80,95 ^b
37.	Tryptophan	85,32 ^a	0,25 ^c	29,78 ^b
38.	Tyrosine	79,68 ^a	21,11 ^b	1,58 ^b
39.	Ursolic acid	95,99 ^a	21,87 ^b	100 ^a
40.	valine	75,26 ^a	20,05 ^b	88,62 ^b

Keterangan :

% Human Intestinal Absorpsi (% HIA) = (a) 70-100% *well absorbed*
(b) 20-70% *moderately absorbed*

(c) 0-20% *poorly absorbed*

In Vitro Caco-2 cell permeability (nm sec⁻¹) = (a) >70 *higher permeability*
(b) 4-70 *medium permeability*
(c) <4 *low permeability*

Plasma protein binding (%) = (a) >90 *strongly bound*
(b) < 90 *weakly bound*

Hasil dari pre-ADMET senyawa yang terkandung dalam mengkudu menunjukkan bahwa dari 40 senyawa uji berdasarkan parameter HIA terdapat 2

senyawa yang penyerapannya kurang yaitu deacetylasperulosidic acid dan rutin, 10 senyawa yang penyerapannya cukup yaitu 4-epi-borreriagenin, arginine, aspartic acid, asperuloside tertracetate, glutamic acid, hexose, histidine, quercetin, serine, threonine dan 28 senyawa lainnya memiliki penyerapan yang baik. Berdasarkan parameter Caco-2 hasil dari senyawa uji terdapat 6 senyawa yang memiliki permeabilitas rendah, diantaranya alizarin, caprylic acid, hexose, quercetin, scopoletine, dan tryptophan. Sedangkan berdasarkan parameter *protein plasma binding* nilai senyawa uji yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan kuat terdapat 13 senyawa uji, dan terikat lemah terdapat 16 senyawa uji. Sehingga dapat disimpulkan dari keseluruhan parameter Pre-ADMET terdapat 9 senyawa yang dapat di absorpsi dan didistribusi dengan baik, diantaranya 2-pentanone, 3-methylebutanal, alanine, caproic acid, damnacanthal, kaempferol, lucidin, proline, dan valine. (Tabel IV.6)

Kemudian dilakukan prediksi sifat toksisitas senyawa yang terkandung dalam mengkudu menggunakan program aplikasi *Toxtree*®. Parameter yang digunakan yaitu *Cramer Rules*, *Benigni/Bossa rulebase*, dan *Kroes TTC decision tree*. *Cramer rules* ini digunakan untuk mengklasifikasikan senyawa berdasarkan tingkat toksisitas untuk dapat dijadikan obat oral yang diharapkan, dibagi menjadi tiga kelas yaitu kelas I (*low class*) yang memiliki senyawa dengan struktur kimia sederhana sehingga produk akhirnya tidak berbahaya karena menunjukkan tingkat toksisitasnya yang rendah. Kelas II (*Intermediate class*) yang menunjukkan bahwa senyawa berada pada pertengahan, dimana strukturnya termasuk kelompok yang fungsional tetapi lebih reaktif dibanding kelas I, tetapi

tidak mengandung struktur yang menunjukkan toksisitas seperti senyawa di kelas III. Kelas III (*high class*) yang menunjukkan toksisitas yang signifikan karena memiliki gugus fungsi yang reaktif.^{34,35} *Benigni/Bossa rulebase* tujuannya untuk memprediksi karsinogenisitas dan mutagenisitas senyawa dilihat dari strukturnya. Karsinogenik genotoksik menyebabkan kerusakan perubahan genetik, sedangkan karsinogenik nongenotoksik menyebabkan kerusakan mekanisme sekunder yang tidak terkait langsung dengan kerusakan gen.³⁶ Sedangkan parameter *Kroes TTC* ini tujuannya untuk menurunkan tingkat toksisitas berdasarkan ambang batas paparan senyawa pada manusia yang nilainya diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok, yaitu kelompok 1: 1800 µg/orang/hari menunjukkan bahwa zat tidak memiliki masalah keamanan, kelompok 2: 540 µg/orang/hari yang menunjukkan bahwa resiko dapat diabaikan karena memiliki toksisitas yang rendah, kelompok 3 dengan 90 µg/orang/hari membutuhkan data yang lebih spesifik untuk resiko toksisitas.^{34,35}

Tabel IV. 7
Hasil Prediksi Sifat Toksisitas Senyawa yang Terkandung Dalam Mengkudu
(*Morinda citrifolia* L.)

No.	Senyawa	Crammer	Benigni/Bossa	Kroes TTC
		Rules	Rulebase	Decision tree
1.	2-Pentanone	1	8,9	1
2.	3-Methylebutanal	1	1,9	2
3.	4-Epi-borreriagenin	3	8,9	1
4.	Alanine	1	8,9	1
5.	Alizarin	3	1,9	2

6.	Arginine	1	8,9	1
7.	Aspartic acid	1	8,9	1
8.	Asperuloside tetracetate	3	8,9	1
9.	Beta-sitosterol	3	8,9	1
10.	Caproic acid	1	8,9	1
11.	Caprylic acid	1	8,9	1
12.	Cysteine	1	8,9	1
13.	Damnacanthal	3	1,9	2
14.	Deacetylasperulosidic acid	3	8,9	1
15.	Ethyl caproate	1	8,9	1
16.	Ethyl caprylate	1	8,9	1
17.	Glutamic acid	1	8,9	1
18.	Hexose	1	8,9	1
19.	Histidine	1	2,8	1
20.	Isoleucine	1	8,9	1
21.	Kaempferol	3	8,9	1
22.	Leucine	1	8,9	1
23.	Linoleic acid	1	8,9	1
24.	Lucidin	3	1,9	2
25.	Methionine	1	8,9	1
26.	Methyl decanoate	1	8,9	1

27.	Methyl octanoate	1	8,9	1
28.	Morindone	3	1,9	2
29.	Proline	1	8,9	1
30.	Quercetin	3	2,9	1
31.	Rubiadin	3	1,9	2
32.	Rutin	3	2,8	1
33.	Scopoletine	3	8,9	2
34.	Serine	1	8,9	1
35.	Soranjidiol	3	2,9	2
36.	Threonine	1	8,9	1
37.	Tryptophan	1	8,9	1
38.	Tyrosine	1	2,8	1
39.	Ursolic acid	1	8,9	1
40.	valine	1	8,9	1

Keterangan:

Cramer rules = (1) Substances with simple chemical structures and fix which efficient modes of metabolism exist, suggesting a low order of oral toxicity

(2) Substances which possess structures that are less innocuous than class I substances, but do not contain structural features suggestive of toxicity like those substances in class III

(3) Substances with chemical structures that permit no strong initial presumption of safety or may even suggest significant toxicity or have reactive functional groups.

Benigni/Bossa Rulebase = (1) Structural Alert for genotoxic carcinogenicity

(2) Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity

(8) Negative for genotoxic carcinogenicity

(9) Negative for nongenotoxic carcinogenicity

Kroes TTC = (1) Substances would not be expected to be a safety concern

(2) Negligible risk (low probability of life-time cancer risk greater than 1 in 10⁶)

Hasil prediksi toksisitas pada 40 senyawa mengkudu berdasarkan parameter *cramer rules* terdapat 14 senyawa yang memiliki tingkat toksisitas tinggi diantaranya 4-Epi-borreriagenin, Alizarin, Asperuloside tetracetate, Beta-sitosterol, Damnacanthal, Deacetylasperulosidic acid, Kaempferol, Lucidin, Morindone, Quercetin, Rubiadin, Rutin, Scopoletine, Soranjidiol. Sedangkan senyawa yang lainnya memiliki toksisitas yang rendah. Hasil penelitian dari parameter *benigni/bossa rulebase* menunjukkan terdapat 6 senyawa yaitu 3-methylebutanal, alizarin, damnacanthal, lucidin, morindone, rubiadin yang menunjukkan positif peringatan struktural untuk karsinogenisitas genotoksik tetapi negatif untuk karsinogenisitas nongenotoksik, 3 senyawa yang menunjukkan positif peringatan struktural untuk karsinogenisitas nongenotoksik tetapi negatif untuk karsinogenisitas genotoksik yaitu histidine, rutin, dan tyrosin, terdapat 2 senyawa yang menunjukkan positif peringatan structural karsinogenisitas nongenotoksik tetapi dapat juga negatif nongenotoksik yaitu quercetin dan soranjidiol dan 29 senyawa yang lainnya negatif terhadap karsinogenisitas genotoksik dan nongenotoksik. Sedangkan hasil senyawa dari parameter *kroes TTC* terdapat 8 senyawa yang memiliki resiko toksisitas rendah namun dapat diabaikan yaitu senyawa 3-methylebutanal, alizarin, damnacanthal, lucidin, morindone, rubiadin, scopoletine, dan soranjidiol. Sedangkan sisanya memiliki keamanan yang baik bagi tubuh. Namun dari keseluruhan parameter toksisitas dapat disimpulkan bahwa terdapat 23 senyawa yang aman bagi tubuh manusia, diantaranya 2-pentanone, alanine, arginine, aspartic acid, caproic acid, caplrylic acid, cysteine, ethyl caproate, ethyl caplylate, glutamic acid, hexose, isoleucine, leucine, linoleic

acid, methionine, methyl decanoat, methyl octanoate, proline, serine, threonine, tryptophan, ursolic acid, dan valine (Tabel IV.7)

