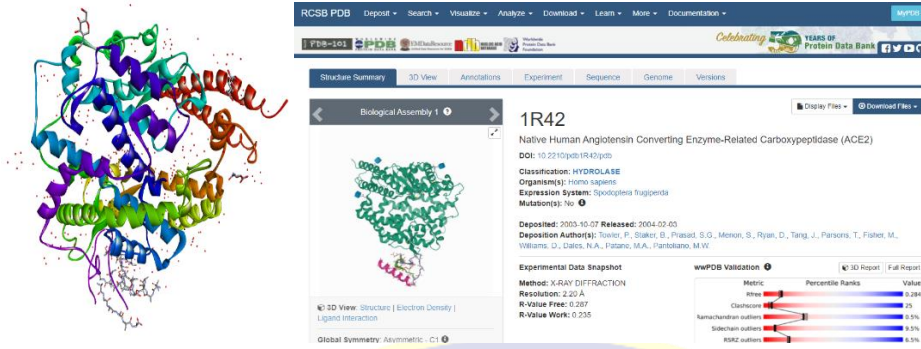


## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan pengujian penambatan molekuler pada senyawa antrakuinon. Senyawa antrakuinon merupakan ligan uji terhadap 3 reseptor SARS COV-2 yaitu *main protease*, *Angiotensin Converting Enzyme-2* dan *Spike protein* dengan menggunakan metode *structur based drug design* (SBDD). Metode SBDD merupakan metode perancangan obat baru yang didasarkan pada struktur makromolekul target. Penelitian penambatan molekul ini menggunakan 7 senyawa uji antrakuinon.

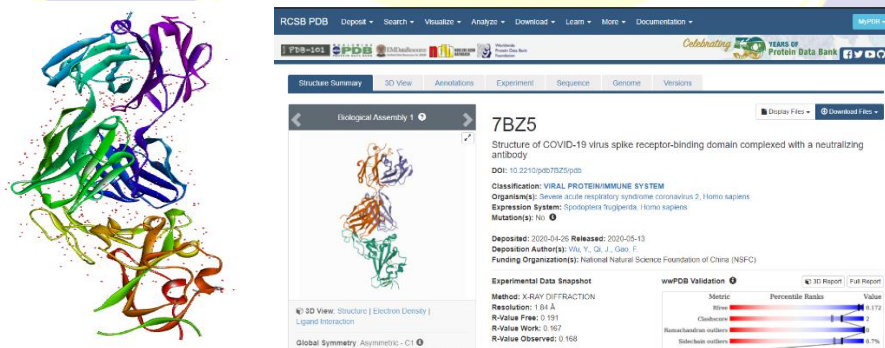
Makromolekul dipilih berdasarkan resolusi  $\leq 2\text{\AA}$ , memiliki karakteristik yang tidak bermutasi, dan kompleks dengan ligan alami. Struktur makromolekul 3D dari *main protease* (6M2N), *Angiotensin Converting Enzyme-2* (1R42), dan *Spike protein* (7BZ5) diperoleh dengan cara diunduh dari situs PDB pada alamat <https://www.rcsb.org/structure/6M2N> , <https://www.rcsd.org/structure/1R42>, dan <https://www.rcsb.org/structure/7BZ5> . Reseptor diunduh dengan format .sdf. setelah itu makromolekul tersebut kemudian dilakukan preparasi dengan tujuan agar proses penambatan molekul berjalan dengan optimal.



Gambar V.1 Struktur 3D makromolekul ID 1R42



Gambar V.2 Struktur 3D makromolekul ID 6M2N

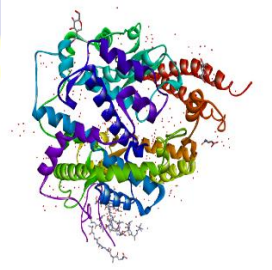
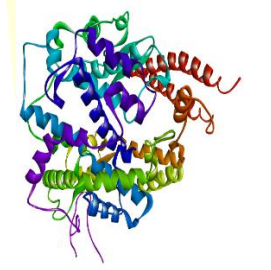
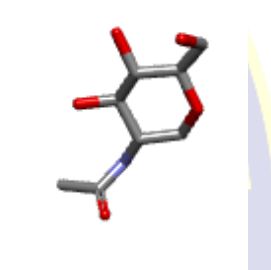
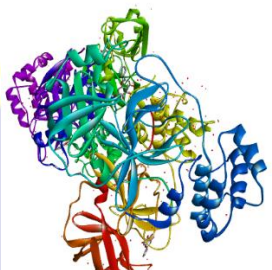
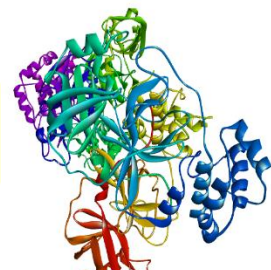
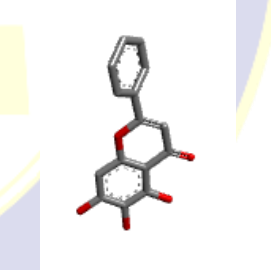
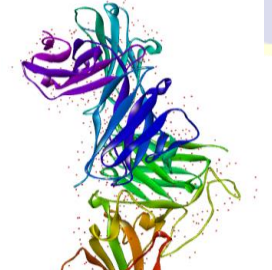

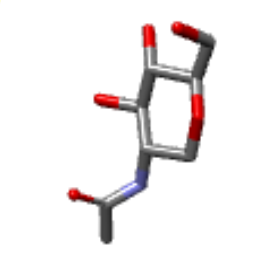


Gambar V.3 Struktur 3D makromolekul ID 7BZ5

Preparasi dilakukan dengan cara memisahkan reseptor dari ligan alaminya dan menghilangkan molekul air dengan menggunakan *software Discovery Studio* 2017. Ligan alami dan reseptor disimpan dalam format .pdb. setelah itu dilakukan validasi dengan cara penambatan kembali reseptor pada ligan alaminya untuk mendapatkan nilai RMSD menggunakan *software AutoDock Tools*.

**Tabel V.1**

Makromolekul hasil preparasi menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*

ID	Kompleks	Reseptor	Ligan
1R42			
6M2 N			
7BZ5			

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan diantaranya yaitu validasi metode penambatan *molekuler docking* dengan cara menambatkan kembali *native* ligan pada reseptor yang telah dipisahkan melalui proses preparasi makromolekul. Validasi metode penambatan *molekuler* dilakukan dengan tujuan memastikan metode yang digunakan valid dan memenuhi persyaratan. Parameter dari validasi sendiri yaitu nilai RMSD  $<2\text{\AA}$ . Syarat RMSD  $<2\text{\AA}$  menjadi parameter kesuksesan metode penambatan *molekuler* dikarenakan semakin kecil nilai RMSD maka posisi tumpang tindih antara *native* ligan akan semakin mirip baik sebelum dan sesudah melakukan *docking*.

Validasi metode penambatan *molekuler docking* dilakukan dengan menambahkan muatan *gasteiger* pada ligan untuk memperbaiki muatan reseptor sehingga dapat memberikan hasil perhitungan antara interaksi ligan dengan reseptor, selanjutnya dilakukan penambahan *hydrogen* agar suasana *docking* mendekati PH netral (7), dan terakhir pengaturan torsi yang bertujuan untuk melihat titik rotasi ligan sehingga didapatkan ligan dalam format (.pdbqt). Pada reseptor dilakukan penambahan muatan *Kollman* untuk memberi muatan pada residu asam amino yang berupa energi potensial sehingga didapatkan reseptor dengan format file (.pdbqt).

```

doc - Notepad
File Edit Format View Help
npts 12 20 12 # num.grid points in xyz
gridfld reseptor.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types NA C OA # ligand atom types
receptor reseptor.pdbqt # macromolecule
gridcenter 39.235 83.957 46.738 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map reseptor.NA.map # atom-specific affinity map
map reseptor.C.map # atom-specific affinity map
map reseptor.OA.map # atom-specific affinity map
elecmap reseptor.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap reseptor.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

```

**Gambar V. 4** Grid-box pada reseptor ID PDB 1R42

```

doc - Notepad
File Edit Format View Help
npts 20 18 20 # num.grid points in xyz
gridfld reseptor.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types A OA # ligand atom types
receptor reseptor.pdbqt # macromolecule
gridcenter -47.18 0.738 -6.662 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map reseptor.A.map # atom-specific affinity map
map reseptor.OA.map # atom-specific affinity map
elecmap reseptor.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap reseptor.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

```

**Gambar V. 5** Grid-box pada reseptor ID PDB 6M2N

```

doc - Notepad
File Edit Format View Help
npts 12 16 20 # num.grid points in xyz
gridfld reseptor.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N NA OA SA # receptor atom types
ligand_types NA C OA # ligand atom types
receptor reseptor.pdbqt # macromolecule
gridcenter -81.616 -17.395 23.913 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map reseptor.NA.map # atom-specific affinity map
map reseptor.C.map # atom-specific affinity map
map reseptor.OA.map # atom-specific affinity map
elecmap reseptor.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap reseptor.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

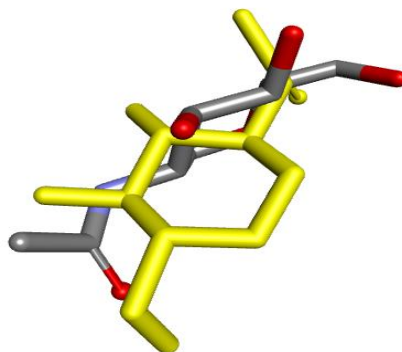
```

**Gambar V. 6** Grid-box pada reseptor ID PDB 7BZ5

Penambatan kembali reseptor dengan *native* ligan (*re-docking*) yaitu dengan menginput file dengan format (.pdbqt) dan melakukan pengaturan *grid-box* untuk menentukan sisi aktif ligan pada reseptor dengan koordinat *grid-center* (posisi x, y, dan z). Koordinat yang digunakan dalam penambatan molekul pada reseptor 1R42 dengan pusat koordinat (X,Y,Z) berturut-turut adalah 39.235; 83.957; 46.738 dengan *spacing* 0,375 dan volume kotak 12x20x12, pada reseptor 6M2N pusat koordinat (X,Y,Z) berturut-turut adalah -47.18; 0.738; -6.662 dengan *spacing* 0.375 dan volume kotak 20x18x20, dan pada reseptor 7BZ5 pusat koordinat (X,Y,Z) berturut-turut adalah -81.6161; -17.395; 23.913 dengan *spacing* 0.375 dan volume kotak 12x16x20. File pengaturan *grid-box* disimpan dengan format (.gpf).

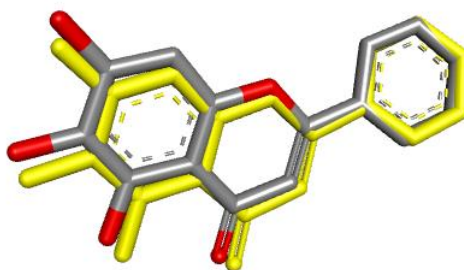
Pengaturan parameter docking dilakukan dengan perubahan pada *Number of GA Runs* menjadi 100 kali *running* atau 100 kali penambatan dan pemilihan metode *Genetic Algorithm* untuk memberikan solusi penempatan pada reseptor sesuai dengan *binding site* protein. Selanjutnya pengaturan parameter *docking* disimpan dalam bentuk format file (.dpf) pada autodock4. Data hasil *re-docking* dapat dilihat dalam file dengan format (.dlg).

RMSD dihasilkan dari jarak penyimpangan antara posisi ligan sebelum dan sesudah *docking*. Validasi metode *docking* akan berhasil apabila posisi ligan sesudah dan sebelum docking memiliki kemiripan, semakin mirip maka semakin valid metode yang digunakan. Penyimpangan dihitung dari jarak tumpang tindih kedua posisi ligan.



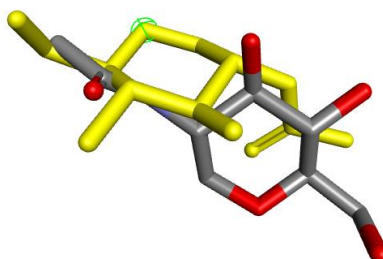
**Gambar V. 7** Visualisasi tumpang tindih hasil validasi metode *molecular docking*

ID PDB 1R42



**Gambar V. 8** Visualisasi tumpang tindih hasil validasi metode *molecular docking*

ID PDB 6M2N



**Gambar V. 9** Visualisasi tumpang tindih hasil validasi metode *molecular docking*

ID PDB 7BZ5

Hasil validasi pada penelitian ini dinyatakan valid karena dari tiga reseptor memiliki nilai RMSD yang memenuhi persyaratan  $< 2 \text{ \AA}$ . Nilai RMSD makromolekul yang telah di validasi yaitu  $1.525 \text{ \AA}$  untuk reseptor *Angiotensin Converting Enzyme 2* dengan kode PDB 1R42,  $0.386 \text{ \AA}$  untuk reseptor *Main Protease* dengan kode PDB 6M2N, dan  $1.860 \text{ \AA}$  untuk reseptor *Spike Protein* dengan kode PDB 7BZ5. Selain nilai RMSD, diperoleh juga nilai konstanta inhibisi (KI) dan nilai *binding affinity* ( $\Delta G$ ). Kemampuan senyawa untuk berinteraksi dengan makromolekul target dilihat dari nilai  $\Delta G$ , sedangkan untuk melihat kesetabilan struktur kompleks yang terbentuk dari ligan dengan makromolekul dapat dilihat dari nilai KI. Nilai dari  $\Delta G$  berbanding lurus dengan nilai KI, yaitu semakin kecil nilai  $\Delta G$  dan KI maka akan menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi dan sebaliknya. Nilai  $\Delta G$  dan KI dari hasil validasi terhadap reseptor 1R42 berturut-turut yaitu  $-2.08 \text{ kkal/mol}$  dan  $29.99 \text{ mM}$ , pada reseptor 6M2N yaitu  $-8.45 \text{ kkal/mol}$  dan  $635.02 \text{ nM}$ , dan pada reseptor 7BZ5 yaitu  $-2.02 \text{ kkal/mol}$  dan  $32.92 \text{ mM}$ .

**Tabel V.2**  
Hasil Validasi

ID	RESEPTOR	Ligan Alami	RMSD	$\Delta G$	ki
1R42	<i>Angitensin Converting Enzyme</i> (ACE 2)	2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose	$1.525 \text{ \AA}$	$-2.08 \text{ kkal/mol}$	$29.99 \text{ mM}$

6M2N	<i>Main Protease</i> (MPRO)	5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	0.386 Å	-8.45 kkal/mol	635.02 nM
7BZ5	<i>Spike Protein</i>	2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose	1.860 Å	-2.02 kkal/mol	32.92 mM

Ligan pembanding dan ligan uji dilakukan preparasi berupa optimasi yang bertujuan untuk meminimasi energi. Ligan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa turunan antrakuinon yang banyak tersebar pada tanaman sebanyak 7 senyawa. Struktur tiga dimensi dari ligan diunduh dari situs *pubchem* dengan format pengunduhan (.sdf), kemudian senyawa-senyawa uji yang telah diunduh dibuka di *software chemoffice 15.0* untuk melihat struktur dua dimensi yang akan dikonversi menjadi struktur tiga dimensi menggunakan *software chem3D* dan dilakukan proses minimisasi menggunakan tools MM2. Tujuan dari minimisasi struktur sendiri untuk melihat bentuk stabil dari struktur dan agar dapat ditambatkan pada reseptor.

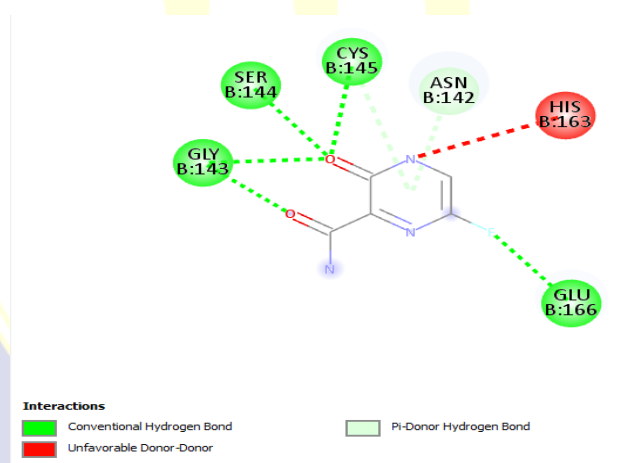
Penambatan molekul pada ligan uji dan ligan pembanding terhadap reseptor dilakukan dengan cara yang sama pada tahap validasi yaitu mengatur posisi *grid-box* dan menentukan parameter yang akan digunakan pada proses penamabatan

molekul. Koordinat yang digunakan disesuaikan berdasarkan posisi koordinat ligan alami pada saat validasi metode *molecular docking*. Sedangkan untuk parameter docking yang digunakan yaitu *Genetic Algoritma (GA)* dan mengatur *Number of GA Runs* menjadi 100. *Genetic Algoritma (GA)* merupakan metode yang akan memberikan solusi pada penempatan reseptor sesuai dengan *binding site* protein, sedangkan *Number of GA Runs* diatur menjadi 100 kali penambatan dalam satu kali *running* untuk menghasilkan 100 konformasi. Pengaturan disimpan dengan output analisis *Lamarckian GA* dalam format (.dpf).

Hasil analisis penambatan molekul senyawa antrakuinon dengan protein target akan menghasilkan 3 parameter uji diantaranya nilai energi bebas ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi (KI), dan residu asam amino. Nilai energi bebas dapat menggambarkan stabilitas dan spontanitas pengikatan antara ligan uji dengan protein target. Senyawa uji memiliki ikatan stabilitas dan spontanitas yang baik apabila nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) yang dihasilkan semakin rendah ( $<0$ ). Afinitas ikatan ligan dengan protein target dipengaruhi oleh nilai konstanta inhibisi (KI). Besar afinitas berbanding terbalik dengan konstanta inhibisi, dimana semakin besar nilai KI maka semakin kecil afinitas ligan uji dengan reseptor. Pada proses penambatan, interaksi permukaan dapat digambarkan sebagai pengenalan antara protein target dengan ligan. Interaksi permukaan yang memiliki nilai yang tinggi akan memberikan peluang yang tinggi juga bagi senyawa aktif untuk berikatan dengan protein target. Sedangkan residu asam amino dapat menunjukkan bahwa ligan mampu menghambat aktifitas protein target dan mampu mempengaruhi afinitas protein target. Ikatan hydrogen merupakan ikatan yang diharapkan pada

interaksi ikatan kimia, dimana semakin banyak ikatan hydrogen maka senyawa uji semakin baik untuk digunakan sebagai inhibitor. Senyawa aktif yang memiliki ikatan hidrogen dan residu asam amino protein reseptor yang sama dengan kontrol, dapat dikatakan memiliki ikatan yang kuat dengan protein target.<sup>34</sup>

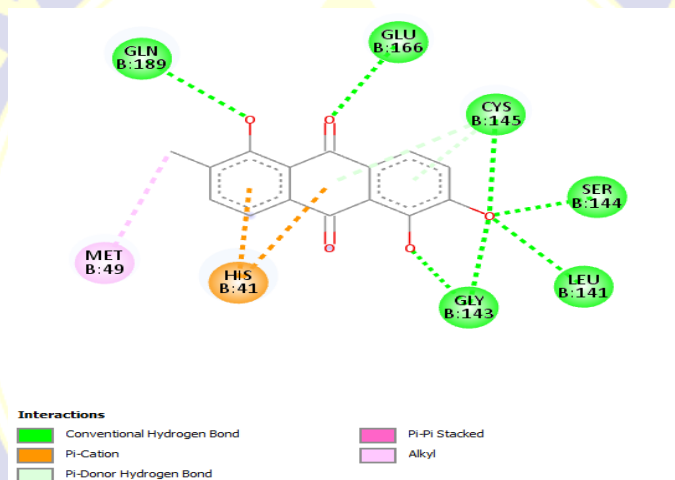
Hasil penambatan *molecular docking* dari ke 7 senyawa uji pada reseptor *main protease* (6M2N) dengan favipiravir sebagai kontrol penghambat, nilai ikatan energi bebas favipiravir sebesar -3.44 kcal/Mol dan konstanta inhibisi 3220  $\mu$ M. Interaksi ikatan kimia dan residu asam amino yang terbentuk yaitu 4 ikatan hydrogen konvensional pada GLY:143, GLU:166, CYS:145, dan SER:144. Ikatan lain yang terbentuk yaitu ikatan residu asam amino Pi-Donor hydrogen ASN:142.



**Gambar V. 10** Visualisasi residu asam amino penambatan Favipiravir terhadap reseptor SARS-CoV-2 *main protease* ID 6M2N

Dari interaksi ligan uji dengan reseptor *main protease* (6M2N) terdapat 5 senyawa yang memiliki nilai ikatan energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi (KI) yang lebih besar dari ligan pembanding namun tidak lebih besar dari ligan alami. Senyawa Morindone memiliki nilai  $\Delta G$  dan KI yang lebih besar dari ligan pembanding namun tidak lebih besar dari ligan alami yaitu dengan nilai  $\Delta G$  dan KI

secara berturut-urut yaitu  $-7.48$  kkal/mol dan  $3.27$   $\mu$ M. Kesamaan residu asam amino ligan uji morindone terhadap ligan pembanding favipiravir terdapat pada interaksi ikatan hydrogen konvensional yang meliputi GLY:143, GLU:166, dan SER:144. Terdapat satu senyawa yang memiliki ikatan energi bebas yang memiliki nilai sangat besar (positif) yaitu senyawa morindin dengan nilai  $+6.65$  kcal/Mol, artinya senyawa tersebut tidak memiliki spontanitas dan stabilitas karena secara termodinamika semakin negatif nilai energi bebas maka ligan tersebut semakin stabil dan akan memiliki reaksi yang spontan begitupun sebaliknya.<sup>35</sup>



**Gambar V. 11** Interaksi Morindone terhadap reseptor *main protease* 6M2N

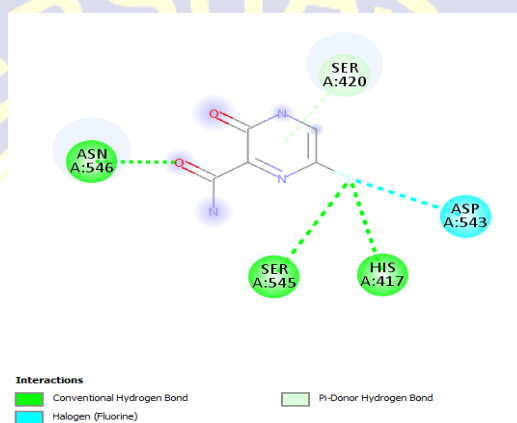
**Tabel V.3**

Hasil Penambatan Molekul Senyawa turunan Antrakuinon terhadap Reseptor *main protease* 6M2N dengan nilai terbaik

NO.	SENYAWA	$\Delta G$ (kcal/Mol)	$k_i$ ( $\mu$ molar)	ASAM AMINO
1.	Morindin	+6.65	-	CYS:145,HIS:41:164,GLN:189, ASN:142,ASP:187

2.	Anthranol	-6.21	27.95	MET:165:49,CYS:145:44, HIS:41,GLN:189
3.	Aloe-emodin	-7.10	6.27	GLY:143,GLU:166,MET:165, CYS:145,HIS:41,ASN:142
4.	Alizarin	-7.19	5.37	GLY:143,LEU:141,GLU:166, MET:165,CYS:145,HIS:41, SER:144
5.	Emodin	-7.21	5.22	GLY:143,GLU:166,MET:165:49, CYS:145:44,HIS:41,GLN:189
6.	Krisofanol	-7.24	4.93	GLY:143,GLU:166,MET:165, CYS:145,HIS:41,ASN:142
7.	Morindone	-7.48	3.27	GLY:143,LEU:141,GLU:166, CYS:145,HIS:41,SER:144, GLN:189,MET:49
8.	Favipiravir (ligan pemanding)	-3.44	3220	GLY:143,GLU:166,CYS:145, HIS:163,SER:144,ASN:142
9.	<b>5,6,7- trihydroxy-2- phenyl-4H- chromen-4-one (ligan alami)</b>	-8.45	0.635	GLY:143,LEU:141,GLU:166, ASN:142,MET:165:49, CYS:44:145,HIS:41

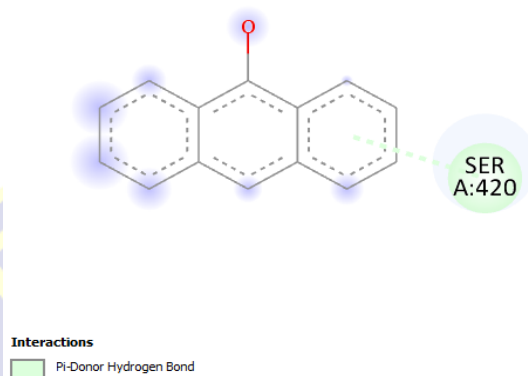
Hasil penambatan *moleculer docking* dari ke 7 senyawa uji pada reseptor *angiotensin converting enzyme-2* (1R42) dengan favipiravir sebagai kontrol penghambat, nilai ikatan energi bebas favipiravir sebesar -1.64 kcal/Mol dan konstanta inhibisi 63.30 mM. Residu asam amino yang terbentuk yaitu SER:420:545, ASN:546, HIS:417 dan ASP:543. dengan total 4 residu asam amino dan diantaranya 3 ikatan hydrogen pada SER:420:545, ASN:546, dan HIS:417.



**Gambar V. 12** Visualisasi residu asam amino penambatan Favipiravir terhadap Reseptor SARS-CoV-2 *Angiotensin Converting Enzyme-2* ID IR42

Pada reseptor *Angiotensin covering enzyme-2* (1R42), dari ke 7 senyawa uji hanya 1 senyawa uji yang memiliki nilai ikatan energi ( $\Delta G$ ) yang lebih rendah dari ligan pembanding dan ligan alami. Senyawa Anthranol memiliki nilai  $\Delta G$  dan KI terendah dibanding senyawa uji lain yaitu -2.57 kkal/mol dan 12.99 mM. kesamaan residu asam amino dari senyawa uji anthranol terhadap ligan pembanding favipiravir terdapat pada interaksi Pi-ikatan donor hydrogen (SER;420). Terdapat 5 senyawa yang memiliki ikatan energi bebas yang memiliki nilai sangat besar (positif) yaitu senyawa aloe-emodin, emodin, krisofanol, morindin, dan morindone. Artinya senyawa tersebut tidak memiliki spontanitas dan stabilitas karena secara

termodinamika semakin negatif nilai energi bebas maka ligan tersebut semakin stabil dan akan memiliki reaksi yang spontan begitupun sebaliknya.<sup>35</sup>



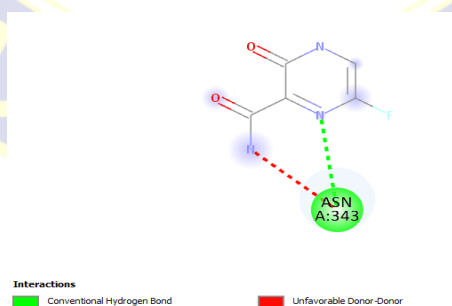
**Gambar V. 13** Interaksi Anthranol terhadap reseptor *Angiotensin converting enzyme-2 1R42*

**Tabel V.4**  
Hasil Penambatan Molekul senyawa turunan Antrakuinon terhadap reseptor *Angiotensin converting enzyme-2 1R42*

NO.	SENYAWA	$\Delta G$ (kcal/Mol)	$k_i$ (mMolar)	ASAM AMINO
1.	Krisofanol	+7.36	-	SER:420:545:317, ASN:546,HIS:417
2.	Morindone	+2.93	-	SER:420,ASN:546
3.	Emodin	+2.72	-	SER:420:317:545, ASN:546
4.	Morindin	+2.46	-	SER:420:545,ASN:546, HIS:417

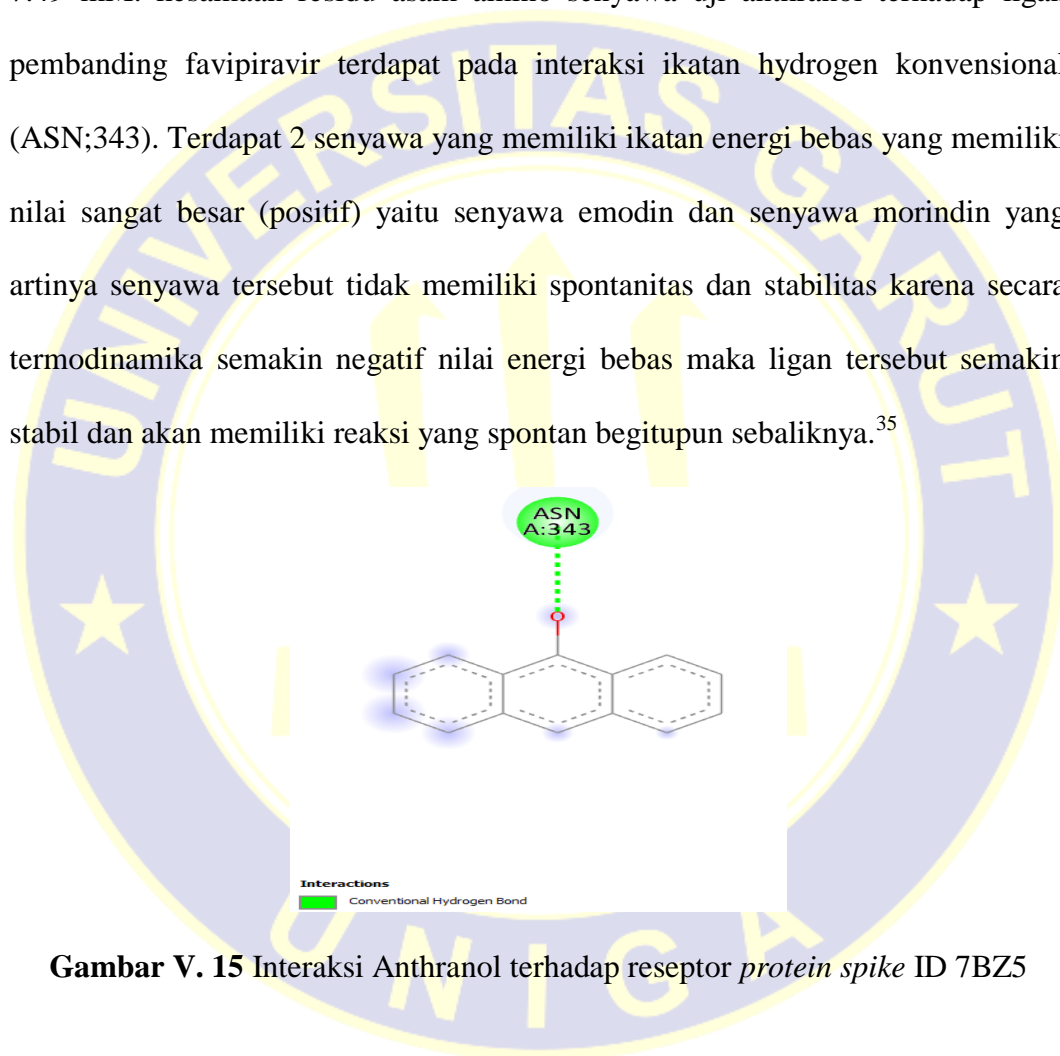
5.	Aloe-emodin	+1.74	-	SER:420,ASN:546
6.	Alizarin	-1.82	46.28	SER:420,ASN:546
7.	Anthranol	-2.57	12.99	SER:420
8.	Favipiravir (ligan pembeding)	-1.64	63.30	SER:420:545,ASN:546, HIS:417,ASP:543
9.	<b>2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose (ligan alami)</b>	-2.08	29.99	SER:420,ASN:546

Hasil penambahan *molecular docking* dari ke 7 senyawa uji pada reseptor *spike protein (7BZ5)* dengan favipiravir sebagai kontrol penghambat, nilai ikatan energi bebas favipiravir sebesar -2.13 kcal/Mol dan konstanta inhibisi 27.28 mM. Residu asam amino yang terbentuk yaitu ASN:343 dengan total 1 residu asam amino dan termasuk ikatan hidrogen yang memiliki kesamaan dengan kontrol dan ligan uji.



**Gambar V. 14** Visualisasi residu asam amino penambahan Favipiravir terhadap reseptor SARS-CoV-2 *Protein spike ID 7BZ5*

Pada reseptor *Spike protein* (7BZ5), dari ke 7 senyawa uji hanya 5 senyawa yang memiliki nilai ikatan energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi (KI) lebih rendah dibanding ligan alami dan pembanding. Senyawa Anthranol memiliki nilai ikatan energi ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi (KI) terendah dengan nilai -2.90 kkal/mol dan 7.49 mM. kesamaan residu asam amino senyawa uji anthranol terhadap ligan pembanding favipiravir terdapat pada interaksi ikatan hydrogen konvensional (ASN;343). Terdapat 2 senyawa yang memiliki ikatan energi bebas yang memiliki nilai sangat besar (positif) yaitu senyawa emodin dan senyawa morindin yang artinya senyawa tersebut tidak memiliki spontanitas dan stabilitas karena secara termodinamika semakin negatif nilai energi bebas maka ligan tersebut semakin stabil dan akan memiliki reaksi yang spontan begitupun sebaliknya.<sup>35</sup>



**Gambar V. 15** Interaksi Anthranol terhadap reseptor *protein spike* ID 7BZ5

**Tabel V.5**  
 Hasil Penambatan Molekul senyawa turunan Antrakuinon terhadap reseptor  
*protein spike 7BZ5*

NO.	SENYAWA	$\Delta G$ (kcal/Mol)	ki (mMolar)	ASAM AMINO
1.	Emodin	+6.20	-	ASN:343
2.	Morindin	+1.93	-	GLY:339,ASN:343, LEU:368,SER:371:373, VAL:367
3.	Morindone	-2.23	23.22	GLY:339,LEU:368,PHE:342
4.	Aloe-emodin	-2.29	21.03	GLY:339
5.	Krisofanol	-2.56	13.23	GLY:339,ASN:343, LEU:368,PHE:342:374:338
6.	Alizarin	-2.67	11.09	ASN:343
7.	Anthranol	-2.90	7.49	ASN:343
8.	Favipiravir (ligan pemanding)	-2.13	27.28	ASN:343
9.	<b>2-acetamido- 2-deoxy-beta- D- glucopyranose</b>	-2.02	32.92	GLY:339,ASN:343, LEU:368,PHE:342:338

Senyawa uji dapat menjadi kandidat obat apabila memiliki bentuk molekul yang ideal. Bentuk ideal suatu senyawa yaitu jika memiliki kemiripan sifat fisikokimia dengan obat oral. Parameter yang dapat menentukan suatu senyawa memiliki bentuk yang ideal yaitu dengan aturan *Lipinski's Rule of Five*.

Semua senyawa dilakukan prediksi *drug likeness*, prediksi ini dilakukan menggunakan aplikasi online berbasis web dengan alamat [www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp](http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp). Dengan mengikuti aturan *Lipinski's Rule of Five*. Ketentuan *Lipinski's Rule of Five* diantaranya bobot molekul <500 Da, nilai Log P <5, jumlah donor ikatan hidrogen <10 dan jumlah akseptor ikatan hidrogen <10. Bobot molekul (BM) >500 akan sulit untuk menembus membran sel, oleh karena itu bobot molekul suatu senyawa dapat mempengaruhi distribusi obat. Semakin kecil bobot molekul maka semakin mudah obat berdifusi menembus membrane sel.

Nilai Log P menunjukkan koefisien kelarutan molekul dalam air atau lemak yang dapat mempengaruhi sifat fisikokimia yaitu lipofilitas dari suatu senyawa. Semakin kecil nilai Log P maka senyawa bersifat hidrofilik dan semakin besar nilai Log P maka senyawa bersifat hidrofobik. Apabila suatu senyawa bersifat hidrofobik maka molekul dapat tertahan lebih lama pada *lipid blayer* membuat molekul terdistribusi secara luas dalam tubuh dan akan meningkatkan toksisitas sehingga selektivitas senyawa menjadi menurun dalam mencapai target. Namun apabila senyawa bersifat hidrofilik maka molekul akan tertahan pada *lipid blayer* sehingga akan sulit untuk mencapai target namun akan mudah untuk tereksresikan. Oleh karena itu ketentuan *lipinski's rule of five* untuk nilai Log P adalah <5.

Donor dan akseptor ikatan hydrogen merupakan sifat fisikokimia yang penting dimana kedua parameter ini mempengaruhi permeabilitas membrane *lipid blayer* dan kapasitas ikatan hydrogen. Terlalu banyaknya jumlah akseptor dan donor hydrogen akan mengganggu permeabilitas membrane sehingga untuk mengabsorpsi molekul dibutuhkan energi yang lebih besar. Nilai donor dan akseptor dalam ketentuan *lipinski's rule of five* yaitu donor ikatan hidrogen  $<5$  dan akseptor ikatan hidrogen  $<10$ .

Dari hasil penelitian yang dilakukan pada 7 senyawa uji turunan antrakuinon, hanya 1 senyawa uji yang tidak memenuhi dan 6 senyawa lainnya memenuhi aturan ketentuan *lipinski's rule of five*. Artinya 6 senyawa yang memenuhi syarat memiliki bioavailabilitas yang baik dan dapat dikonsumsi secara oral.

Selanjutnya senyawa uji dilakukan prediksi farmakokinetik yang meliputi absorpsi dan distribusi obat menggunakan aplikasi PreADMET berbasis online dengan alamat web <https://preadmet.bmdrc.kr/adme/> . sebelum melakukan pengujian pada situs PreADMET, ligan uji terlebih dahulu digambar satu persatu struktur molekulnya menggunakan aplikasi *Chemdraw 15* lalu dilakukan analisis pada situs web PreADMET.

Parameter yang digunakan prediksi farmakokinetik ini yaitu untuk absorpsi dilihat dari nilai sel *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan *human colon adenocarcinoma* (CaCO<sub>2</sub>). Sedangkan untuk prediksi distribusi yaitu dilihat dari nilai *Protein Plasma Binding* (PPB). *Human Intestinal Absorption* (HIA) menunjukkan kemampuan suatu senyawa untuk dapat terabsorpsi oleh usus dan untuk menunjukkan bioavailabilitas berdasarkan rasio ekskresi kumulatif dari urin, feses

dan empedu. Semakin tinggi nilai HIA maka senyawa yang diprediksi memiliki absorpsi yang baik, range nilai HIA yaitu apabila <20% maka senyawa kurang terserap, 20-70% cukup terserap dan 70-100% senyawa dapat terserap dengan baik.<sup>36</sup>

Parameter *human colon adenocarcinoma* (CaCO<sub>2</sub>) dilakukan untuk mengetahui transport obat melalui epitel intestinal, dimana sel CaCO<sub>2</sub> merupakan sel buatan untuk menunjukkan kemampuan suatu senyawa terhadap sel CaCO<sub>2</sub> itu sendiri. Nilai CaCO<sub>2</sub> <4 nm/sec menunjukkan permeabilitas rendah, nilai CaCO<sub>2</sub> 4-70 nm/sec menunjukkan permeabilitas sedang, dan nilai CaCO<sub>2</sub> >70 nm/sec menunjukkan permeabilitas yang tinggi. Permeabilitas yang diharapkan yaitu permeabilitas dengan nilai CaCO<sub>2</sub> 4-70 nm/sec yang menunjukkan bahwa permeabilitas sedang dikarenakan senyawa yang memiliki permeabilitas sedang terjadi karena senyawa tidak bersifat terlalu hidrofilik atau terlalu lipofilik sedangkan senyawa yang memiliki permeabilitas tinggi akan memiliki sifat senyawa yang lipofilik begitupun senyawa dengan permeabilitas rendah akan memiliki sifat senyawa yang hidrofilik.<sup>36</sup>

Parameter *Protein Plasma Binding* (PPB) merupakan parameter yang digunakan untuk memprediksi tingkat keterkaitan suatu senyawa dengan protein plasma. *Protein Plasma Binding* (PPB) menjadi penentu fraksi obat dalam bentuk bebas yang akan didistribusikan ke berbagai jaringan. Keterkaitan senyawa terhadap protein plasma berbanding terbalik dengan distribusi senyawa, hal itu dikarenakan obat dalam bentuk bebas dapat lebih mudah menembus membrane sel untuk mencapai target kerja sedangkan apabila ikatan senyawa dengan protein ini

kuat maka senyawa tersebut kurang terdistribusi dengan baik. Sehingga ikatan yang diharapkan dari *Protein Plasma Binding* (PPB) yaitu ikatan yang lemah. Nilai dari *Protein Plasma Binding* (PPB) sendiri yang diharapkan yaitu <90% dengan prediksi ikatan senyawa dengan protein plasma yang lemah dan >90% memprediksikan ikatan senyawa dengan protein plasma yang kuat.

Hasil analisis absorpsi dan distribusi senyawa uji menunjukkan bahwa hanya ada 2 senyawa yang dapat terdistribusi dengan baik dan ada 5 senyawa yang tidak terdistribusi dengan baik karena senyawa tersebut terikat sangat kuat dengan protein plasma sehingga sulit untuk didistribusikan. Senyawa yang dapat terdistribusi dengan baik yaitu senyawa uji Aloe-emodin dan senyawa uji Morindin. Dari 7 senyawa hanya 1 yang tidak memiliki kemampuan permeabilitas terhadap CaCO-2 yaitu senyawa uji Alizarin.

Selanjutnya prediksi toksisitas menggunakan aplikasi *Toxtree*®. Prediksi toksisitas dilakukan untuk mengetahui keamanan dari sifat senyawa yang sedang diuji berdasarkan sifat toksik. Parameter dari prediksi toksisitas ini meliputi *Cramer rules*, *Kroes Threshold of Toxicological Concern* (TTC), dan *Benigni/Bossa rulebase*. *Cramer rules* merupakan parameter klasifikasi tingkat toksisitas dari suatu senyawa yang berdasarkan pohon keputusan yang berisi pernyataan dengan jawaban “yes” atau “no”. Jawaban-jawaban dari satu-persatu pertanyaan akan mengarah pada pernyataan yang lain sampai ke klasifikasi akhir berupa kelas I (*low class*), kelas II (*intermediate class*) dan kelas III (*high class*). Senyawa yang memiliki tingkat toksisitas yang rendah karena memiliki struktur yang sederhana akan ditunjukkan pada kelas I (*low class*), untuk senyawa yang memiliki toksisitas

menengah karena memiliki struktur yang lebih kompleks dari kelas I dan tidak mengandung struktur yang dapat menyebabkan toksisitas seperti kelas III akan ditunjukkan pada kelas II (*intermediate class*), dan terakhir senyawa yang menunjukkan tingkat toksisitas yang tinggi dengan adanya struktur reaktif dalam menimbulkan toksisitas ditunjukkan pada kelas III (*high class*).

*Kroes TCC* merupakan parameter metode yang digunakan untuk memprediksi toksisitas senyawa dengan memperkirakan nilai ambang batas paparan senyawa terhadap tubuh manusia dengan hasil yang dapat ditunjukkan yaitu berupa kemungkinan tingkat resiko pemaparan. Nilai ambang batas pemaparan terbagi menjadi tiga kelompok yaitu 1800 µg/orang/hari pada kelompok 1 yang dapat menunjukkan bahwa senyawa aman bagi tubuh, 540 µg/orang/hari pada kelompok 2 yang menunjukkan resiko toksisitas yang rendah bagi tubuh sehingga dapat diabaikan, dan 90 µg/orang/hari pada kelompok 3 yang menunjukkan bahwa diperlukan data toksisitas yang lebih spesifik untuk menilai resiko toksisitas suatu senyawa.

*Benigni/Bossa rulebase* merupakan metode yang ditunjukkan untuk memprediksi sifat karsinogenik dan mutagenic berdasarkan dari struktur *genotoxic* dan *non genotoxic*. Karsinogenik *genotic* dilakukan untuk memprediksi senyawa mampu menyebabkan kerusakan genetic perubahan DNA, sedangkan untuk karsinogenik *non genotic* ditunjukkan untuk memprediksi kerusakan mekanisme sekunder yang tidak terkait langsung dengan gen. Aktivitas karsinogenik suatu senyawa dapat dilihat dari gugus fungsi yang dapat menimbulkan efek

karsinogenik, beberapa gugus fungsi ada yang terdaftar dalam *structural alerts* (peringatan struktur) yang dapat menyebabkan karsinogenik suatu senyawa.

Berdasarkan hasil prediksi toksisitas terhadap 7 senyawa uji, pada prediksi *Cramer rules* semua senyawa memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dan termasuk kedalam kelas III (*High class*). Prediksi *Kroes TCC* menunjukkan bahwa toksisitas semua senyawa masuk pada golongan senyawa yang memiliki resiko toksisitas rendah bagi tubuh namun masih bisa diabaikan. Sedangkan hasil prediksi menurut parameter *Benigni/Bossa rule base* menunjukkan semua senyawa positif memiliki peringatan struktur genotoksik, akan tetapi semua senyawa tidak memiliki potensi efek karsinogenik non-genotoksik karena hasil menunjukkan *negative for nongenotoxic carcinogenicity*.

