



Penambatan Molekuler Senyawa Aktif Sirih Merah (*Piper crocatum*) pada Butirilkolinesterase sebagai Kandidat Antialzheimer

Rahmadi Ganesha Putri, Mega Safithri*, Husnawati Husnawati, Rini Kurniasih

Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
Jalan Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680 Indonesia

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

DOI: 10.20961/alchemy.19.1.59676.68-85

Received 24 February 2022, Accepted 02 January 2023, Published 22 March 2023

Kata kunci:

antialzheimer;
butirilkolinesterase;
penambatan
molekuler;
sirih merah.

ABSTRAK. Alzheimer adalah salah satu penyakit neurodegeneratif kronis dan menjadi penyakit yang sering dialami oleh orang lanjut usia. Perubahan yang terjadi dari penyakit Alzheimer, yakni penurunan fungsi kognitif, memori, dan perubahan perilaku secara permanen. Senyawa aktif pada daun sirih merah memiliki kesamaan kandungan dengan daun sirih hijau untuk menghambat butirilkolinesterase (BChE). Butirilkolinesterase adalah salah satu enzim yang berperan dalam penanganan penyakit Alzheimer dikaitkan dengan terbentuknya Alzheimer, yakni hipotesis kolinergik. Penelitian dilakukan menguji daya inhibisi senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah terhadap aktivitas butirilkolinesterase melalui pendekatan simulasi penambatan molekul. Penelitian menggunakan dua metode, yakni penggabungan penapisan virtual dan penambatan molekul sebagai tahapan awal pengembangan daun sirih merah terhadap aktivitas penghambatan butirilkolinesterase. Hasil dalam penelitian diperoleh, daya inhibisi terbaik ditemukan pada 1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane sebesar 0,4888 μM dan energi bebas pengikatan sebesar $-8,6 \text{ kkal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Residu yang berperan dalam menghambat butirilkolinesterase, yakni pada pengikatan substrat oleh ligan uji, yakni Tyr-332 dan Trp-82. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai sumber referensi dalam menemukan alternatif pengobatan penyakit Alzheimer.

Keywords:

antialzheimer;
butyrylcholinesterase;
molecular docking;
Piper crocatum.

ABSTRACT. Molecular Docking of the Active Compound of Red Betel (*Piper crocatum*) on Butyrylcholinesterase as an Antialzheimer's Candidate. Alzheimer's is a chronic neurodegenerative disease often experienced by the elderly. Changes that occur from Alzheimer's disease such as permanent decline in cognitive function, memory, and behavioral changes. The active compounds in red betel leaves have similar contents with green betel leaves to inhibit butyrylcholinesterase (BChE). Butyrylcholinesterase is an enzyme that may play an important role in the treatment of Alzheimer's disease associated with the formation of Alzheimer's, the cholinergic hypothesis. The study tested the inhibition power of the active compounds contained in red betel leaves against the activity of butyrylcholinesterase through a molecular docking simulation approach. The method in the study used the merger of virtual screening and molecular docking as the initial stage for the development of red betel leaves against the inhibitory activity of butyrylcholinesterase. The result in the study found the best inhibitory power was found at 1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane of 0.4888 μM and binding free energy of $-8.6 \text{ kkal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The residues that play a role in the inhibition of butyrylcholinesterase on substrate binding by test ligands were Tyr-332 and Trp-82. The research result can be used as a reference in finding alternative treatments for Alzheimer's disease.

PENDAHULUAN

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer's disease/AD*) adalah penyakit yang diakibatkan adanya neurodegeneratif kronis. Alzheimer ditandai dengan gejala paling umum dari demensia. Penderita Alzheimer secara klinis ditandai dengan adanya penurunan memori dan gangguan fungsi kognitif lainnya secara progresif sehingga menyebabkan kemampuan dalam melakukan kegiatan sehari-hari hilang secara permanen (Macdonald et al., 2017; Halova et al., 2018; Jasiiecki and Wasag, 2019). Menurut WHO (2020), di seluruh dunia terdapat sebanyak 50 juta orang hidup dengan demensia. Penyakit Alzheimer, yang merupakan bentuk paling umum dari demensia berkontribusi sebanyak 60 – 70% kasus. Jumlah penyakit ini diprediksi akan meningkat pada tahun 2030 sebanyak 82 juta orang dan pada tahun 2050 menjadi 152 juta orang. Menurut Kemenkes (2016), jumlah penderita Alzheimer di Indonesia pada tahun 2013 diperkirakan sebanyak 1 juta. Jumlah tersebut diestimasikan meningkat pada tahun 2030 sebanyak dua kali lipat dari pada jumlah sebelumnya, bahkan pada tahun 2050 diperkirakan sebanyak 4 juta. Hal

tersebut menjadikan penyakit Alzheimer sebagai masalah yang serius bagi masyarakat dan pusat perhatian peneliti (Dalai *et al.*, 2013).

Salah satu mekanisme molekuler terjadinya penyakit Alzheimer adalah melalui keberadaan enzim butirilkolinesterase (BChE) yang berhubungan dengan sistem kolinergik. Sistem kolinergik merupakan sistem yang mengatur jalannya regulasi asetilkolin (ACh). Penghambatan enzim BChE pada sistem kolinergik dapat mencegah dan memperbaiki kondisi penyakit Alzheimer (Kumar *et al.*, 2018). BChE adalah enzim yang berperan menghidrolisis asetilkolin (ACh) menjadi kolin dan asam asetat, selain itu enzim BChE juga berperan mengakhiri penerusan sinyal syaraf dari neurotransmitter ACh. ACh adalah neurotransmitter yang berperan penting menghantarkan sinyal-sinyal memori di otak. Adanya berbagai hambatan pada sistem kolinergik serta rendahnya kadar asetilkolin menjadi penyebab penurunan fungsi daya ingat dan kognitif pada penderita Alzheimer (Colovic *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018).

Terapi yang telah dikembangkan untuk menangani penyakit Alzheimer saat ini adalah melalui penghambatan enzim kolinesterase, salah satunya menggunakan enzim asetilkolinesterase (AChE). Namun, pada saat kondisi penyakit Alzheimer terjadi, aktivitas kadar enzim AChE menurun. Sementara itu, enzim selain AChE, yaitu BChE, memiliki aktivitas kadar yang meningkat atau bahkan tetap, sehingga hal tersebut mengakibatkan enzim BChE dapat menggantikan peran dari enzim AChE. Selain enzim AChE, Enzim BChE merupakan bagian dari enzim kolinesterase yang berperan sebagai pendukung setelah peran AChE (Masson *et al.*, 2009; Tsuno, 2009; Kumar *et al.*, 2018). Enzim BChE berdampak secara signifikan dalam perantaraan kolinergik pada penderita Alzheimer. Obat sintetik yang sudah disepakati oleh lembaga *Food and Drug Administration (FDA)* dan sangat selektif terhadap penghambatan enzim BChE adalah *Tacrine* (Tsuno, 2009; Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2018). Meskipun obat sintetik memiliki kemanjuran yang tinggi dalam pengobatan penyakit Alzheimer, dosis yang tidak spesifik dapat menyebabkan efek samping yang berbahaya bagi tubuh hingga berpotensi sebagai hepatotoksik (Khoury *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019).

Oleh karena itu, pemanfaatan senyawa dari bahan alam menjadi pilihan untuk terapi penyakit Alzheimer dengan efek samping yang rendah. Berdasarkan penelitian secara *in vitro* Dalai *et al.* (2013) menunjukkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih hijau, yaitu *Hydroxychavicol (HCH)* mampu menghambat enzim AChE dan enzim BChE sebagai agen terapi penyakit Alzheimer, dengan standar yang digunakan berupa *Galanthamine*. Serta menurut penelitian secara *in vivo* Darvesh (2016) menunjukkan bahwa BChE diketahui terlibat dalam akumulasi plak β -amiloid yang merupakan salah satu patologi utama penyakit Alzheimer.

Adanya kesamaan kandungan yang terdapat di dalam daun sirih hijau dengan daun sirih merah, yaitu *Hydroxychavicol (HCH)* yang merupakan salah satu komponen aktif khas yang dijumpai pada kedua tanaman tersebut dan termasuk ke dalam golongan minyak atsiri (Fadlilah, 2015; Almasyhuri and Sundari, 2019; Fatmawaty *et al.*, 2019). Adanya keterkaitan kesamaan kandungan yang terdapat di dalam daun sirih merah yang juga mampu menghambat BChE sebagai agen terapi penyakit Alzheimer. Namun, belum ada penelitian yang menunjukkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah mampu menghambat enzim BChE melalui simulasi penambatan molekuler. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan memprediksi potensi senyawa aktif yang terkandung di dalam daun sirih merah sebagai kandidat antialzheimer melalui mekanisme penghambatan BChE dengan menggunakan penggabungan dua metode, yaitu penapisan virtual dan penambatan molekuler secara *in silico*.

METODE PENELITIAN

Alat- alat yang dibutuhkan pada penelitian yakni *Notebook* dengan spesifikasi prosesor Intel Celeron CPU N2840 2,16GHz, Windows 8, dan RAM 4GB yang dilengkapi dengan *software* seperti *MarvinView*, *Discovery Studio 2016*, *AutoDockTools*, *PyRx-Virtual Screening Tool*, *LigPlot+ v.2.2.4*, dan *PyMOL v.1.7.4.5*. Bahan- bahan yang dibutuhkan pada penelitian yakni struktur tiga dimensi reseptor, yaitu enzim BChE kode PDB 6ESY (ekstensi *.PDB), struktur tiga dimensi ligan pembanding, yaitu *Tacrine* (ekstensi *.SDF), dan struktur tiga dimensi ligan uji yang berasal dari senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah sesuai Tabel 1 yang diperoleh dari literatur berupa skripsi dan jurnal tahun 2010 hingga 2022 menggunakan kata kunci seperti *active compound red betle*, *Piper crocatum* atau dengan nama senyawa aktif sirih merah. Prosedur percobaan yang digunakan pada penelitian ini dimulai dari preparasi struktur ligan, preparasi struktur reseptor, validasi area penambatan (*gridbox*), penapisan virtual, prediksi farmakokinetik dan toksisitas, penambatan molekuler, dan diakhiri dengan visualisasi dua dimensi penambatan molekuler ligan terhadap BChE (analisis hasil). Berikut adalah uraian dari masing- masing prosedur percobaan.

Tabel 1. Daftar senyawa-senyawa aktif pada daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Nama Molekul	Sumber	Compound CID
<i>Methyleugenol</i>		7127
<i>Protocatechuic acid</i>		72
<i>Arginine hydrochloride</i>		6322
<i>4-methoxyindole</i>		138363
<i>2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol</i>	Ramadani (2018)	1511955
<i>1-(1,4-dithian-2-ylmethyl)-3-(3-methoxypropyl)thiourea</i>		1165102
<i>Leucylleucinamide hydrochloride</i>		4162211
<i>1h-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride</i>		2734673
<i>Hydroxychavicol</i>		70775
<i>Chavicol</i>		68148
<i>Chavibetol</i>		596375
<i>Allylpyrocatechol</i>		292101
<i>Carvacrol</i>	Fadlilah (2015)	10364
<i>Eugenol</i>		3314
<i>P-cymene</i>		7463
<i>Cineole</i>		2758
<i>Caryophyllene</i>		5281515
<i>Beta-phellandrene</i>		11142
<i>Gamma-terpinene</i>		7461
<i>Terpinolene</i>		11463
<i>Copaene</i>		19725
<i>Alpha-caryophyllene</i>	Parfati and Windono (2016)	5281520
<i>Alpha-terpinene</i>		7462
<i>Beta terpineol</i>		8748
<i>Quercetin</i>		5280343
<i>Flemiphilippinin a</i>		1007422
<i>Isocaviunin 7-o-gentiobioside (2e, 5e)-2,5-bis(2,4,5-trimethoxybenzylidene)cyclopentanone</i>	Septiani (2017)	4425737 6372604
<i>2-ethoxyethyl {[3-(4-tert-butylphenoxy)-4-oxo-4h-chromen-7-yl]oxy}acetate</i>		1562226
<i>Anthocyanidins</i>		145858
<i>Gamma-curcumene</i>		1230427
<i>Estragole</i>		8815
<i>2,4-dihydroxy-allylbenzene</i>		7020923
<i>Ar-curcumene</i>	Lister <i>et al.</i> (2014)	92139
<i>Sesquisabinene hydrorate</i>		2005553
<i>Aurone</i>		6537099
<i>Catechin</i>		9064
<i>Chalcone</i>		637760
<i>Alpha-thujene</i>		17868
<i>Alpha-pinene</i>		6654
<i>Sabinene</i>		18818
<i>Germacrene d</i>	Suri <i>et al.</i> (2021)	5317570
<i>Alpha-selinene</i>		1085661
<i>Safrole</i>		5144

Tabel 1. Daftar senyawa-senyawa aktif (lanjutan)

Nama Molekul	Sumber	Compound CID
<i>Sofalcone</i>		5282219
<i>Methyl 3-(4-hydroxy-2-oxo-2h-chromen-3-yl)-3-(4-(octyloxy)phenyl)propanoate</i>		9163686
<i>Oprea1_127864</i>		3754322
<i>1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane</i>		6850126
<i>5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanopheny)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid</i>	Safithri <i>et al.</i> (2016)	22103275
<i>Isobenzofuran-4,7-dione</i>		1220914
<i>Guanidine tartrate</i>		875
<i>N-(decanoyl)piperidine</i>		4130169
<i>Urapidil</i>		5639
<i>6-amino-2-(3-aminopropylamino)-9-(cyclohexylmethyl)-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1h-purin-8-one</i>		1529773304
<i>3-(3,4-dimethoxyphenyl)propionic acid</i>		75019
<i>Schisandrin b</i>	Wedaswari (2018)	108130
<i>Ethyl l-serinate hydrochloride</i>		2724186
<i>Naphthalene</i>		931
<i>Phenol</i>	Setiawan <i>et al.</i> (2019)	996
<i>Trans-sabinene hydrate</i>		12315151

Preparasi Struktur Ligan (Modifikasi)

Preparasi struktur ligan dilakukan dengan metode merujuk laporan Pratama, 2015; Hasanah, 2017 dengan modifikasi. Sejumlah 60 ligan uji yang berasal dari senyawa aktif sirih merah (*Piper crocatum*) dan ligan pembanding, yaitu *Tacrine* diunduh melalui basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) yang merupakan struktur tiga dimensi. Berikutnya struktur ligan disimpan (ekstensi *.PDB) menggunakan program *MarvinView*. Struktur ligan kembali dibuka menggunakan program *Discovery Studio 2016* untuk dilakukan preparasi dengan cara ditambah ion hidrogen. Berikutnya dilakukan optimasi pada ligan melalui program *AutoDockTools*, kemudian diatur jumlah ikatan torsi.

Preparasi Struktur Reseptor (Modifikasi)

Preparasi Struktur Reseptor dilakukan dengan metode merujuk laporan Fikrika *et al.*, 2016 dengan modifikasi. Reseptor yang digunakan pada penelitian ini merupakan enzim BChE yang memiliki kode PDB 6ESY diunduh yang merupakan struktur tiga dimensi. Struktur reseptor diperoleh dari basis data *RCSB PDB* (<https://www.rcsb.org/>) (Berman *et al.*, 2000). Proses yang dilakukan pada preparasi reseptor, yaitu pertama, membuka program *Discovery Studio 2016* untuk dilakukan preparasi dengan cara dihilangkan air, molekul-molekul, ligan yang tertambat pada reseptor, dan ion yang berada pada reseptor. Reseptor pada penelitian ini memiliki sejumlah dua rantai yang bersifat homodimer, yaitu rantai A dan rantai B. Rantai yang digunakan pada penelitian adalah rantai B. Berikutnya rantai A dihapus, dan kemudian ligan alami yang tertambat pada reseptor merupakan *Thioflavin T* yang juga berada pada masing-masing rantai baik di rantai A dan di rantai B. Ligan alami yang digunakan pada penelitian adalah ligan alami *Thioflavin T* (TFX612) yang berada pada rantai B, maka berikutnya ligan alami yang lain dihapus. Kedua struktur diletakkan di lembar kerja secara terpisah, untuk reseptor dan ligan alami dilakukan preparasi struktur ligan yang sama seperti pada tahap sebelumnya. Berikutnya dilakukan optimasi pada kedua struktur melalui program *AutoDockTools*, pertama untuk reseptor dilakukan penambahan ion hidrogen, ion nonhidrogen, dan perhitungan muatan Gasteiger.

Validasi Area Penambatan (*gridbox*) (Modifikasi).

Validasi Area Penambatan (*gridbox*) dilakukan dengan metode merujuk laporan Anitha *et al.*, 2013; Perdana, 2018; Sari *et al.*, 2020 dengan modifikasi. Pada tahap validasi area penambatan (*gridbox*), proses pencarian

validasi tersebut menggunakan teknik secara *oriented docking* melalui program *AutoDockTools*. Zona *gridbox* yang diperoleh yakni *size x* 8, *size y* 12, dan *size z* 6, dan *center x* 14,806, *center y* -15,134, *center z* -72,234 serta *spacing* sebesar 1,000 Å. *File-file* yang dibutuhkan dalam simulasi penambatan molekuler, yaitu *file vina*, *file conf*, *file reseptor*, dan *file ligan alami*. Diarahkan simulasi penambatan molekuler melalui program *Command Prompt (CMD)* dengan perintah sebagai berikut “*C:\vina>vina.exe -config conf.txt -log log.txt*”. Diperoleh *file log* dan *file output*.

Berikutnya dilakukan *split* pada program *CMD*, dengan cara diteruskan kembali dengan perintah sebagai berikut “*C:\vina>vina_split.exe -input output.pdbqt*”. Proses ini ditujukan untuk memperoleh secara cepat pose ligan alami hasil validasi secara terpisah dalam bentuk *output*. Sementara selain *output* yang dihasilkan juga terdapat *file log* yang merupakan *file* yang berisi sejumlah energi bebas pengikatan ligan alami hasil validasi dan *RMSD*. *File* ligan dibuka menggunakan program *Discovery Studio 2016* untuk dilihat hasil *RMSD* ligan yang memiliki kemipiran dengan pose ligan alami aslinya. Hasil validasi yang diperoleh. Hasil *RMSD* dapat diterima apabila memiliki *RMSD* sebesar $\leq 2,0$ Å.

Penapisan Virtual (Modifikasi)

Penapisan Virtual dilakukan dengan metode merujuk laporan [Dallakyan and Olson, 2015](#); [Sahoo et al., 2016](#) dengan modifikasi. Sejumlah 60 ligan uji, satu ligan pembanding, dan satu ligan alami yang telah dipreparasi sebelumnya menggunakan program *AutoDockTools* dimasukkan pada program *PyRx-Virtual Screening Tools*. Kemudian, koordinat yang sudah sesuai dengan pencarian validasi area penambatan (*gridbox*) diatur pada: *center x* 14,806; *center y* -15,134; serta *center z* -72,234; dan *spacing* telah terotomatis 1,000 Å. Diperoleh *file* yang berisi energi bebas pengikatan dan *RMSD* dari masing-masing ligan. Ligan uji dinyatakan lolos pada tahap penapisan virtual apabila memiliki nilai energi bebas pengikatan $\geq -6,9$ kkal·mol⁻¹.

Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas (Modifikasi)

Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas dilakukan dengan metode merujuk laporan [Ochieng et al., 2017](#); [Yusriani, 2019](#); [Farhan, 2019](#) dengan modifikasi. Sejumlah ligan yang telah dinyatakan lolos pada tahap penapisan virtual, satu ligan pembanding, dan satu ligan alami, berikutnya dilakukan dengan pencarian struktur *canonical SMILES* ligan dengan cara membuka basis data Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Berikutnya, struktur *canonical SMILES* ligan disalin dan kemudian ditempel melalui basis data SWISSADME (<http://www.swissadme.ch/>) ([Daina et al., 2017](#)) untuk menjalankan analisis prediksi farmakokinetik. Parameter dalam analisis tersebut adalah bobot molekul, hidrogen akseptor, hidrogen donor, MLogP, dan refraktivitas molar. Berikutnya, struktur *canonical SMILES* diakses pada basis data ADMETSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1>) ([Cheng et al., 2012](#)) untuk menjalankan analisis prediksi toksisitas. Parameter dalam analisis tersebut adalah inhibisi *Human ether-a-go-go-Related Gen* (hERG), karsinogenitas, dan toksisitas oral akut.

Penambatan Molekuler (Modifikasi)

Penambatan Molekuler dilakukan dengan metode merujuk laporan [Rachmania et al., 2016](#); [Jeniossa, 2018](#) dengan modifikasi. Ligan uji, ligan pembanding, dan ligan alami yang telah dipreparasi sebelumnya menggunakan program *AutoDockTools* kemudian dilanjutkan dengan proses penambatan molekuler. *File-file* yang dibutuhkan untuk melakukan penambatan molekuler, yaitu *file conf*, *file reseptor*, *file ligan uji* yang telah dinyatakan lolos pada tahap penapisan virtual, dan *file vina*. Tahap selanjutnya adalah simulasi penambatan molekuler pada program *CMD* menggunakan perintah yang sama seperti pada tahap validasi area penambatan (*gridbox*). *File* yang diperoleh pada penambatan molekuler ini, yaitu *file log* dan *file output*. Kemudian, masing-masing ligan uji yang digunakan ialah pose ligan uji yang memiliki nilai energi bebas pengikatan terendah. Ligan dan reseptor di buka melalui program *Discovery Studio 2016* pada lembar kerja yang terpisah. Pada lembar kerja yang berisi ligan lalu disalin, kemudian ditempel pada lembar kerja yang berisi reseptor. Berikutnya ligan ditarik menuju bagian reseptor sehingga ligan tersebut telah menyatu dengan reseptor.

Analisis Hasil (Modifikasi)

Analisis Hasil dilakukan dengan metode merujuk laporan [Ibrohim et al., 2015](#) dengan modifikasi. Hasil penambatan molekuler menggunakan program *AutoDockTools* dianalisis visualisasi ligan terhadap reseptor (enzim BChE) secara dua dimensi menggunakan program *LigPlot+ v.2.2.4*. Analisis yang diperoleh dari interaksi

molekul, yaitu ikatan hidrogen hidrogen yang diilustrasikan dengan garis putus-putus dan interaksi hidrofobik yang diilustrasikan dengan *arc*. Berikutnya, ligan dan reseptor dilakukan analisis dengan visualisasi secara tiga dimensi menggunakan program *PyMOL v.1.7.4.5*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Struktur Ligan dan Reseptor

Sejumlah 60 ligan uji dan satu ligan pembanding yang digunakan merupakan struktur tiga dimensi yang diperoleh dari basis data *PubChem*. Preparasi dan optimasi struktur seluruh ligan menggunakan program *Discovery Studio 2016* dan *AutoDockTools*. Seluruh ligan dipreparasi menggunakan program *Discovery Studio 2016* dengan cara menambah ion hidrogen dan dioptimasi menggunakan program *AutoDockTools* dengan cara menghitung jumlah ikatan torsi. Berikutnya, seluruh ligan yang telah dipreparasi dan dioptimasi dapat disimpan (ekstensi *.PDBQT (*Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)*)). Preparasi pada seluruh ligan bertujuan untuk menghitung energi interaksi antara ligan dengan reseptor sehingga dapat menghasilkan fleksibilitas suatu ligan dengan menambah jumlah ikatan yang dapat diputar oleh suatu ligan ([Meng *et al.*, 2011](#)).

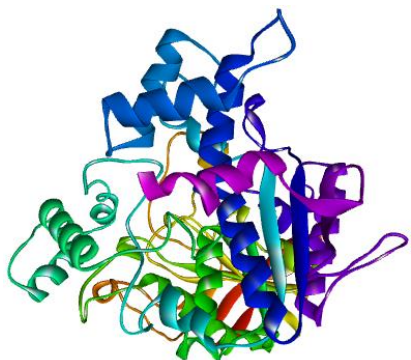
Reseptor pada penelitian merupakan enzim butirilkolinesterase (BChE) dengan kode PDB (*Protein Data Bank*) 6ESY. Kode PDB 6ESY diperoleh dari basis data *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)* yang diunduh (ekstensi *.PDB) dan merupakan struktur tiga dimensi. Kode tersebut memiliki nama lengkap, yaitu *human butyrylcholinesterase in complex with Thioflavin T*. Molekul yang ikut tertambat pada reseptor, yaitu *Thioflavin T*, sebagai ligan alami pada reseptor yang akan digunakan dalam proses validasi area penambatan (*gridbox*) untuk penapisan virtual dan penambatan molekuler. Adapun resolusi yang dimiliki oleh reseptor pada penelitian ialah sebesar 2,8 Å. Reseptor dan ligan alami yang digunakan pada penelitian yaitu rantai B dan ligan alami *Thioflavin T* 612 yang berada pada rantai B. Preparasi dan optimasi struktur reseptor menggunakan program *Discovery Studio 2016* dan *AutoDockTools*. Proses preparasi pada reseptor dengan cara menghilangkan molekul air, ion-ion, serta molekul-molekul yang tertambat pada reseptor yang tidak diperlukan dalam proses penambatan molekuler. Optimasi pada struktur reseptor dilakukan dengan cara menambah ion polar, ion nonpolar, dan menghitung jumlah muatan Gasteiger. Penyesuaian jumlah muatan Gasteiger bertujuan untuk memperoleh dan memperkirakan hasil dari perhitungan di antara interaksi ligan dengan reseptor secara tepat ([Novriadi *et al.*, 2020](#)). Sementara itu, untuk ligan alami dilakukan preparasi dan dioptimasi dengan cara sama seperti pada preparasi struktur ligan. Reseptor dan seluruh ligan yang sudah siap dipreparasi dan dioptimasi disimpan (ekstensi *.PDBQT) agar dapat digunakan untuk proses berikutnya ([Gambar 1](#)).

Ligan pembanding yang digunakan pada penelitian merupakan salah satu obat komersial yang sudah disepakati oleh lembaga *Food and Drug Administration (FDA)*, yakni *Tacrine*. *Tacrine* merupakan obat tertua yang sudah disepakati oleh lembaga *FDA* pada tahun 1993. *Tacrine* memiliki selektivitas dalam menghambat enzim kolinesterase yaitu, AChE dan BChE, akan tetapi selektivitas *Tacrine* dinilai sangat selektif terhadap enzim BChE. Meskipun saat ini, *Tacrine* telah ditarik karena kekurangan klinis, yaitu dapat menyebabkan hepatotoksik, Namun, *Tacrine* tetap dapat digunakan sebagai perancah baik dalam menemukan kandidat anti Alzheimer ([Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2018](#); [Zhang *et al.*, 2020](#)). Jalur mekanisme penghambatan enzim BChE dengan *Tacrine* melibatkan penghambatan secara *reversible*, yaitu melalui residu asam amino Trp-82, Tyr-332, dan His-438. Ketiga asam amino ini berperan secara signifikan terhadap pengikatan substrat ([Zhang *et al.*, 2020](#)). Ligan alami *Thioflavin T* yang tertambat pada reseptor kode PDB 6ESY memiliki dua ligan alami yang tertambat secara bersamaan pada sisi aktif enzim BChE, yaitu *CAS* dan *PAS*. Perbedaan ligan alami yang tertambat pada sisi aktif enzim BChE tidak memiliki pengaruh yang signifikan karena *CAS* dan *PAS* merupakan situs aktif enzim BChE ([Rosenberry *et al.*, 2017](#); [Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2018](#); [Zhang *et al.*, 2020](#)). Penelitian ini difokuskan pada ligan alami yang tertambat pada reseptor dengan jarak yang tidak jauh menuju sisi aktif reseptor, yaitu pada *PAS*. Ligan alami *Thioflavin T* 612 pada rantai B adalah ligan alami yang digunakan pada penelitian ini.

Di samping itu, mode pengikatan *Tacrine* memiliki kesamaan situs sisi aktif dengan *Thioflavin T* 612 rantai B pada enzim BChE. Jalur mekanisme penghambatan enzim BChE oleh *Thioflavin T* 612, yaitu dimulai dari orientasi pengikatan substrat pada *PAS*, residu yang berperan yakni Tyr-332 dan Asp-70. Pada saat substrat terikat pada *PAS*, maka akan membentuk interaksi π -kation. Interaksi tersebut menyebabkan substrat akan diarahkan meluncur ke bawah menuju asam amino Trp-82. Pada tahap ini, ketika substrat berada tepat sejajar dengan serin katalitik, maka akan terjadi proses hidrolisis secara cepat oleh serin katalitik. Selanjutnya diakhiri dengan residu yang berperan sebagai *acyl-binding pocket* yang akan membentuk ikatan satu sama lain untuk menampung substrat berupa asetil ([Rosenberry *et al.*, 2017](#)).

Validasi Area Penambatan (*gridbox*)

Validasi area penambatan (*gridbox*) adalah langkah pertama yang digunakan berdasarkan fungsi penilaian saat melakukan *docking*. Validasi area penambatan diperoleh dari kemampuan struktur ligan alami yang telah tertambat pada reseptor (ligan alami asli). Di mana hal tersebut dapat menyerupai pose ligan alami aslinya kembali. Dalam proses ini parameter yang dijadikan sebagai tolak ukurnya, yaitu *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*). Proses validasi area penambatan (*gridbox*) yang digunakan pada penelitian menggunakan ligan alami *Thioflavin T 612* yang berada pada rantai B dan reseptor yang digunakan adalah rantai B. Proses validasi ini didapatkan zona *gridbox* sebesar; *size x* 8, *size y* 12, dan *size z* 6, dan *center x* 14,806, *center y* -15,134, *center z* -72,234 serta *spacing* sebesar 1,000 Å dan proses tersebut dilakukan sebanyak 10 kali ulangan. Proses validasi dapat diterima apabila perhitungan *RMSD* yang diperoleh oleh suatu ligan lebih kecil atau sama dengan 2,0 Å (Sari *et al.*, 2020). Hasil validasi yang diperoleh pada penelitian ini adalah memiliki rata-rata *RMSD* sebesar 0,89972 Å dan rata-rata energi bebas pengikatan sebesar -6,51 kkal·mol⁻¹. *RMSD* terendah didapat sebesar 0,7141 Å (Gambar 2), maka dapat dinyatakan *RMSD* yang dihasilkan <2,0 Å dan dapat diterima.



Gambar 1. Preparasi struktur reseptor (enzim BChE) (Sumber: Dokumentasi pribadi menggunakan program *Discovery Studio 2016*).



Gambar 2. (a) ligan alami hasil validasi (abu-abu) dan (b) ligan alami asli (kuning) (Sumber: Dokumentasi pribadi menggunakan program *Discovery Studio 2016*).

Penapisan Virtual, Prediksi Farmakokinetik, dan Toksisitas

Penapisan virtual yang digunakan pada penelitian yaitu menggunakan prinsip Penapisan Virtual Berbasis Struktur (PBVS). PBVS memiliki prinsip, yaitu menilai dan memeringkat suatu molekul berdasarkan pengikatan sisi aktif reseptor, di mana molekul yang dikategori sebagai energi bebas pengikatan terendah memiliki kemampuan paling optimal dalam mengikat sisi aktif dari enzim secara kompetitif (Pasupa 2012; Sahoo *et al.*, 2016). Sejumlah 60 ligan uji yang berasal dari senyawa aktif terkandung di dalam daun sirih merah atau dikenal dengan istilah *Piper crocatum*, satu ligan pembanding, dan satu ligan alami yang dilakukan proses penapisan virtual. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat 13 ligan uji yang dinyatakan lolos dengan memiliki nilai energi bebas pengikatan sebanding atau bahkan di atas pada rentang ligan alami. Energi bebas pengikatan yang terdapat pada ligan alami sebesar -6,9 kkal·mol⁻¹. Hal tersebut menggunakan ligan alami sebagai indikator lolos dalam penapisan virtual. Kemudian, sejumlah 13 ligan uji dilakukan analisis farmakokinetik dan toksisitas.

Prediksi farmakokinetik merupakan serangkaian uji pada senyawa kandidat obat, yaitu dapat melintasi membran sel dalam tubuh. Untuk itu, sifat tersebut dianalisis menggunakan aturan *Lipinski's Rule of five*. Aturan dari *Lipinski's Rule of five* dapat menentukan tingkat absorpsi pada *lipid bilayer* di dalam tubuh manusia. Aturan tersebut berupa Bobot Molekul (BM) ≤500 Dalton, Hidrogen Akseptor (HA) ≤10, Hidrogen Donor (HD) ≤5, LogP ≤5 atau MLogP ≤4,15, serta Refraktivitas Molar (RM) berada pada rentang 40–130 (Lipinski, 2001; Rachmania *et al.*, 2015; Paudel *et al.*, 2019). Hasil analisis ligan uji yang diperoleh yakni sejumlah 12 ligan uji yang dinyatakan lolos pada tahap uji Lipinski, di antaranya terdapat tujuh ligan yang tidak memenuhi aturan Lipinski sebanyak satu kategori, yaitu *quercetin*, *Caryophyllene*, *Alpha-Caryophyllene*, *Alpha-Selinene*, *Germacrene D*, *Flemiphilippinin A*, dan *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane*. Satu ligan uji lainnya, yaitu *5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid* tidak memenuhi aturan Lipinski sebanyak lima kategori. Suatu senyawa dapat dikatakan memenuhi aturan Lipinski apabila tidak lebih kecil atau sama dengan dua aturan Lipinski (Lipinski, 2001; Prayoga,

2021), sehingga *5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid* dinyatakan tidak memenuhi aturan Lipinski karena melanggar lebih dari dua aturan Lipinski. Sebanyak 12 ligan uji yang dinyatakan lolos pada aturan Lipinski dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penapisan virtual dan uji Lipinski.

Ligan	Energi bebas pengikatan (kkal·mol ⁻¹)	Bobot molekul (Da)	Hidrogen Akseptor	Hidrogen Donor	MLogP	Refraktivitas Molar
<i>Anthocyanidins</i>	-7,9	207,25	1	0	3,28	66,06
<i>Aurone</i>	-7,9	222,24	2	0	2,39	65,82
<i>quercetin</i>	-7,8	302,24	7	5	-0,56*	78,03
<i>Chalcone</i>	-7,6	208,26	1	0	3,44	66,25
<i>1,2,3,4,5,6,7-heptazycloicosane</i>	-7,5	287,45	7	7*	3,06	109,51
<i>Flemiphilippin A</i>	-7,4	488,57	6	3	3,02	145,13*
<i>5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid</i>	-7,3	578,49*	12*	6*	-3,76*	144,53*
<i>Caryophyllene</i>	-7,3	204,35	0	0	4,63*	66,78
<i>2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol</i>	-7,2	354,40	5	1	2,67	102,18
<i>Catechin</i>	-7,2	290,27	6	5	0,24	74,33
<i>Alpha-Caryophyllene</i>	-7,1	204,35	0	0	4,53*	70,42
<i>Alpha-Selinene</i>	-7,0	204,35	0	0	4,63*	68,78
<i>Germacrene D</i>	-6,9	204,35	0	0	4,53*	70,68
<i>Tacrine</i> (ligan pembanding)	-6,9	198,26	1	1	2,33	63,58
<i>Thioflavin T 612</i> (ligan alami)	-6,9	318,86	0	0	3,92	95,88

Keterangan: *tidak memenuhi aturan Lipinski

Ligan dengan BM >500 Dalton akan sulit menembus membran, baik di kulit maupun di dalam pencernaan (Kelutur *et al.*, 2020). Seluruh ligan memiliki nilai BM <500 Dalton. MLogP merupakan perhitungan yang ditemukan oleh Moriguchi untuk memperkirakan nilai LogP secara sederhana, seperti molekul organik, kecuali metaloorganik dan polimer. Perhitungan MLogP relatif digunakan untuk mencari kandidat obat (Moriguchi *et al.*, 1994; Yusriani, 2019). MLogP berbanding lurus dengan BM, saat nilai MLogP semakin besar maka BM juga akan semakin besar. Akibatnya, semakin sulit suatu ligan untuk dicerna dalam tubuh, maka akan mengganggu metabolisme. Hasil penelitian menunjukkan terdapat tujuh ligan yang memiliki nilai MLogP >4,15. Nilai LogP tidak disarankan bernilai negatif, karena suatu ligan yang memiliki nilai LogP bernilai negatif akan bersifat hidrofilik, sehingga menyebabkan suatu ligan tidak dapat melewati *lipid bilayer* (Lipinski, 2001; Adriani, 2018). Hasil penelitian menunjukkan terdapat satu ligan yang memiliki nilai MLogP bernilai negatif, yaitu *quercetin*. Jumlah HD dan HA menandakan bahwa semakin besar jumlah ikatan hidrogen, dengan demikian energi yang dibutuhkan untuk mengabsorpsi suatu ligan akan semakin besar (Syahputra *et al.*, 2014). Seluruh ligan memiliki HA <10, sementara sejumlah 11 ligan memiliki HD ≤5. RM sangat diperlukan untuk mempelajari interaksi suatu ligan dengan reseptor. RM berhubungan dengan gaya dispersif London yang bekerja dalam interaksi ligan dan reseptor (Khan *et al.*, 2018). Sejumlah 11 ligan memiliki kriteria yang sesuai terhadap RM.

Uji toksisitas merupakan uji kuantitatif yang dapat menentukan derajat suatu senyawa akan hancur di dalam sebuah material biologis atau nonbiologis dan juga dapat mempertimbangkan dosis yang digunakan (Sasmito *et al.*, 2015). Prediksi toksisitas menjadi salah satu parameter yang digunakan dalam penemuan, pengembangan obat yang akan disetujui untuk dipasarkan, yang mana dapat diketahui melalui penilaian keamanan toksisitas dari suatu

obat tersebut. Parameter yang digunakan pada penelitian, yakni inhibisi *Human Ether-a-go-go-Related Gen* (hERG), karsinogenitas, dan toksisitas oral akut (Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019). Inhibisi *Human Ether-a-go-go-Related Gen* (hERG) merupakan saluran gen yang berkaitan pada *ether-a-go-go* manusia, di mana memainkan peran penting pada repolarisasi jantung. Penyumbatan atau pengurangan arus saluran hERG dapat menyebabkan sindrom long (QT LQTS) yang merupakan efek samping jantung, yaitu dapat berakibat fatal bahkan mengancam jiwa seseorang (Lamothe *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019). Seluruh ligan tidak menimbulkan efek samping terhadap inhibisi hERG. Karsinogenitas adalah reaksi obat yang merugikan yang terjadi di dalam tubuh dan menimbulkan efek serius pada kesehatan manusia, seperti kanker akibat obat (Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Seluruh ligan tidak menyebabkan karsinogenitas.

Toksisitas oral adalah titik akhir dan yang pertama digunakan sebagai penentuan kandidat obat. Apabila suatu kandidat obat terdeteksi toksisitas akut, maka dapat dipastikan obat tersebut tidak dapat dilanjutkan sebagai pertimbangan kandidat obat, karena dapat mengganggu kesehatan manusia (Yang *et al.*, 2018). Selain itu, dilakukan uji toksisitas oral akut bertujuan mengetahui dampak yang ditimbulkan pada pemberian obat tunggal dalam kurun waktu 24 jam (Astri *et al.*, 2012). Berdasarkan tingkat toksisitas dari suatu bahan kimia yang dinyatakan dalam median lethal dosis (LD₅₀) dan ditinjau berdasarkan kriteria oleh *US Environmental Protection Agency* (EPA), terdapat empat kategori: a) kategori I memiliki nilai ≤ 50 mg/kg tergolong sebagai sangat racun dan dapat berakibat fatal jika tertelan; b) kategori II memiliki nilai $50 < x \leq 500$ mg/kg tergolong sebagai cukup beracun; c) kategori III memiliki nilai $500 < x \leq 5000$ mg/kg tergolong sebagai sedikit beracun; dan d) kategori IV memiliki nilai > 5000 mg/kg tergolong sebagai tidak beracun (Li *et al.*, 2014). Informasi yang menghadirkan probabilitas pada masing-masing kategori berupa inhibisi hERG, karsinogenitas, dan toksisitas oral akut merupakan sebuah keluaran yang memberikan informasi secara spesifik yang dihasilkan dari basis data admet SAR (Cheng *et al.*, 2011). Tabel 3 menunjukkan prediksi tingkat toksisitas ligan.

Tabel 3. Hasil prediksi toksisitas

Ligan	Inhibisi hERG		Karsinogenitas		Toksisitas Oral Akut	
	Probabilitas	Kategori Inhibitor	Probabilitas	Kategori*	Probabilitas	Kategori
<i>Anthocyanidins</i>	0,8627	lemah	0,8308	NK	0,6219	III
<i>Aurone</i>	0,8778	lemah	0,9363	NK	0,5361	III
<i>Quercetin</i>	0,9781	lemah	0,9450	NK	0,7348	II
<i>Chalcone</i>	0,9045	lemah	0,6105	NK	0,4763	IV
<i>1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane</i>	0,5933	lemah	0,7454	NK	0,6898	III
<i>Flemiphilippin a</i>	0,9833	lemah	0,9085	NK	0,6924	III
<i>5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid</i>	0,8244	lemah	0,8829	NK	0,6064	III
<i>Caryophyllene</i>	0,9225	lemah	0,6863	NK	0,8200	III
<i>2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol</i>	0,9680	lemah	0,8148	NK	0,6442	III
<i>Catechin</i>	0,9666	lemah	0,9539	NK	0,6433	IV
<i>Alpha-caryophyllene</i>	0,9169	lemah	0,6532	NK	0,6889	III
<i>Alpha-selinene</i>	0,8625	lemah	0,7808	NK	0,8468	III
<i>Germacrene D</i>	0,8372	lemah	0,6288	NK	0,8141	III
<i>Tacrine</i> (ligan pembeding)	0,9351	lemah	0,9404	NK	0,7305	II
<i>Thioflavin T 612</i> (ligan alami)	0,9842	lemah	0,7718	NK	0,6652	III

*NK = non karsinogen

Hasil penelitian menunjukkan bahwa toksisitas oral akut yang dimiliki ligan uji lebih banyak berada pada kategori III, yang berarti bahwa seluruh ligan uji memiliki tingkat toksisitas oral akut tergolong sedikit beracun dan beberapa di antaranya kategori II berarti bahwa ligan uji tersebut tergolong cukup beracun dan IV memiliki makna bahwa ligan uji memiliki tingkat toksisitas oral akut tergolong tidak beracun (Tabel 3). Hal ini menunjukkan pula bahwa kategori II dinilai sangat beracun dibandingkan kategori III dan IV. Adapun ligan uji yang berada di kategori II, yaitu *quercetin* dan *Tacrine*. Sehingga, berdasarkan hasil yang telah diperoleh pada penelitian terdapat sejumlah 12 ligan uji yang dinyatakan lolos dalam prediksi toksisitas.

Penambatan Molekuler

Penambatan Molekuler dapat diartikan sebagai orientasi paling cocok dari suatu ligan yang mengikat sebuah reseptor tertentu dan dimanfaatkan untuk memprediksi struktur kompleks antarmolekul atau molekul sejenisnya. Berdasarkan fungsi penilaian dalam *docking*, proses *docking* menempatkan dua langkah dasar, yaitu: 1) prediksi berdasarkan konformasi ligan serta posisi dan orientasi pengikatan ligan atau disebut dengan pose; 2) berdasarkan penilaian energi bebas pengikatan (Meng *et al.*, 2011; Vijesh *et al.*, 2013). Pada tahap pertama dapat disebut *redocking* atau yang dikenal dengan proses pencarian validasi area penambatan (*gridbox*). Pada tahap kedua dapat disebut tahap *scoring*, yaitu prediksi pengikatan ligan dengan reseptor (protein) dengan mempertimbangkan energi bebas pengikatan tertinggi atau yang menunjukkan nilai yang paling negatif (Boittier *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2020; Tallei *et al.*, 2020). Penambatan molekuler bertujuan untuk menyaring sejumlah senyawa yang dilakukan penapisan virtual berdasarkan energi bebas pengikatan dan memprediksi molekul kecil yang dapat menghambat asam-asam amino penting pada protein target.

Penambatan molekuler yang digunakan pada penelitian, yaitu melalui program *AutoDockTools*. Ligan alami yang digunakan adalah *Thioflavin T 612*, ligan uji yang digunakan sejumlah 11, yaitu *Anthocyanidins*, *Aurone*, *quercetin*, *Chalcone*, *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane*, *Caryophyllene*, *2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol*, *Catechin*, *Alpha-Caryophyllene*, *Alpha-Selinene*, dan *Germacrene D*. Penambatan molekuler dapat divisualisasikan menggunakan program *LigPlot+* v.2.2.4 secara dua dimensi dan program *PyMOL* v.1.7.4.5 secara tiga dimensi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ligan uji yang memiliki energi bebas pengikatan terendah yaitu *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* bernilai $-8,6 \text{ kkal}\cdot\text{mol}^{-1}$, sementara ligan uji yang memiliki energi bebas pengikatan tertinggi terdapat tiga ligan, yaitu *Alpha-Caryophyllene*, *Caryophyllene*, dan *Germacrene D* sebesar $-6,9 \text{ kkal}\cdot\text{mol}^{-1}$. *Thioflavin T 612* menunjukkan interaksi hidrofobik secara dominan, di mana asam-asam amino yang berikatan secara hidrofobik yaitu Asp-70, Ser-72, Trp-82, Ala-328, Tyr-332, dan His-438. *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* menunjukkan adanya interaksi secara bersamaan, yaitu interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Asam-asam amino yang berikatan secara hidrofobik yaitu Trp-82, Gly-116, Ala-328, Phe-329, Tyr-332, dan His-438. Ikatan hidrogen pada ligan tersebut dijumpai oleh asam amino Thr-120 dengan jarak berkisar 3,06. Sementara *Alpha-Caryophyllene*, *Caryophyllene*, dan *Germacrene D* menunjukkan interaksi hidrofobik secara dominan (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil penambatan molekuler ligan dengan reseptor BChE.

Ligan	Energi bebas pengikatan ($\text{kkal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Ikatan hidrogen	Jarak ikatan hidrogen (Å)	Interaksi hidrofobik	PAS dan choline-binding pocket
<i>1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane</i>	-8,6	Thr-120	3,06	Trp-82*, Gly-116, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Anthocyanidins</i>	-7,8			Trp-82*, Pro-285, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Aurone</i>	-7,7			Asp-70*, Trp-82*, Pro-285, Phe-329, Tyr-332*, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Chalcone</i>	-7,6			Trp-82*, Pro-285, Phe-329, Tyr-332*	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Quercetin</i>	-7,4	Trp-82*	3,20	Pro-285, Phe-329, Tyr-332*, Trp-430, Met-437, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*

Tabel 4. Hasil penambatan molekuler ligan (lanjutan)

Ligan	Energi bebas pengikatan (kkal·mol ⁻¹)	Ikatan hidrogen	Jarak ikatan hidrogen (Å)	Interaksi hidrofobik	PAS dan choline-binding pocket
<i>Alpha-selinene</i>	-7,3			Trp-82*, Ala-328, Phe-329, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol	-7,2			Asp-70*, Trp-82*, Pro-285, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, Trp-430, Met-437, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Catechin</i>	-7,2	Ala-328, Pro-285, His-438**	2,82, 2,93, 3,12	Trp-82*, Phe-329, Tyr-332*	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Thioflavin T</i> 612 (ligan alami)	-7,0			Asp-70*, Ser-72, Trp-82*, Ala-328, Tyr-332*, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Alpha-caryophyllene</i>	-6,9			Trp-82*, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Caryophyllene</i>	-6,9			Asp-70*, Trp-82*, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, Trp-430	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Germacrene D</i>	-6,9			Asp-70*, Trp-82*, Ala-328, Tyr-332*, Trp-430, Met-437, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
<i>Tacrine</i> (ligan pembanding)	-6,8	Asp-70*	3,01	Trp-82*, Pro-285, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*
5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid	-5,7	Pro-285, Ser-287	3,20, 2,94	Asn-68, Asp-70*, Trp-82*, Gln-119, Thr-120, Ala-328, Phe-329, Tyr-332*, Trp-430, His-438**	Tyr-332*, Asp-70*, Trp-82*

Keterangan : * asam amino berperan penting pada situs pengikatan

** asam amino berperan penting pada situs katalitik

Mekanisme penghambatan enzim BChE dapat dilakukan dengan cara tiga cara, yaitu melalui penghambatan CAS secara kompetitif, PAS secara nonkompetitif, dan tipe campuran (CAS dan PAS). Terdapat asam amino yang berdekatan dengan wilayah CAS yaitu Trp-82. Asam amino ini disebut dengan *choline-binding pocket*. Asam amino Trp-82 akan menghalangi ligan untuk berikatan dengan CAS (Kumar *et al.*, 2018; Agatanovic-Kustrin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). *Thioflavin T* 612 yang digunakan adalah bagian asam amino penting berperan pada PAS. Mekanisme pengikatan substrat pada enzim BChE yaitu pada asam amino Tyr-332, Asp-70, dan Trp-82 (Rosenberry *et al.*, 2017). Sejumlah 11 ligan uji menunjukkan memenuhi asam-asam amino yang terlibat dalam situs pengikatan substrat terhadap enzim BChE dengan *Thioflavin T* 612. Akan tetapi, sejumlah 4 ligan uji memenuhi semua situs asam amino yang berperan sebagai pengikatan substrat terhadap BChE, yakni Tyr-332, Asp-70, dan Trp-82, dan keempat ligan uji menunjukkan interaksi hidrofobik dominan. Seluruh ligan uji menempati residu yang berperan pada pengikatan substrat. Adapun pelabelan yang diberi tanda asteris (**) menandakan bahwa ligan tersebut juga mengikat pada asam amino yang berperan sebagai situs katalitik, yaitu His-

438. Namun, asam amino His-438 merupakan bagian yang berfungsi untuk menghasilkan ikatan hidrogen pada suatu ligan serta membantu dan mempercepat proses hidrolisis yang dilakukan asam amino Ser-198 yang merupakan pemeran utama dalam triad katalitik. Oleh karena itu, asam amino His-438 tidak dijadikan sebagai acuan untuk menghambat enzim BChE (Masson *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020).

Energi Bebas Pengikatan dan Konstanta inhibisi

Parameter analisis hasil *docking* dapat diketahui melalui program *AutoDockTools*. *AutoDockTools* adalah salah satu program yang dapat memprediksi energi bebas pengikatan ligan dengan reseptor berdasarkan fungsi penilaian pada *docking*. Fungsi penilaian yang digunakan yaitu secara tahap *scoring*. Tahap *scoring* adalah tahap yang memadukan antara hasil prediksi energi bebas pengikatan dengan energi bebas pengikatan yang dihasilkan berdasarkan eksperimental (berdasarkan peringkat). Untuk mengevaluasi energi bebas pengikatan dapat diperoleh melalui persamaan rumus energi bebas (ΔG) di dalam hukum termodinamika melalui pencarian nilai konstanta inhibisi. Rumus tersebut dapat diuraikan sebagai berikut (Shityakov and Forster 2014; Du *et al.*, 2016; Salsabila, 2019; Boittier *et al.*, 2020):

$$\begin{aligned}\Delta G \text{ ikatan} &= -R T \ln K \\ \Delta G \text{ penghambatan} &= R T \ln K\end{aligned}\tag{1}$$

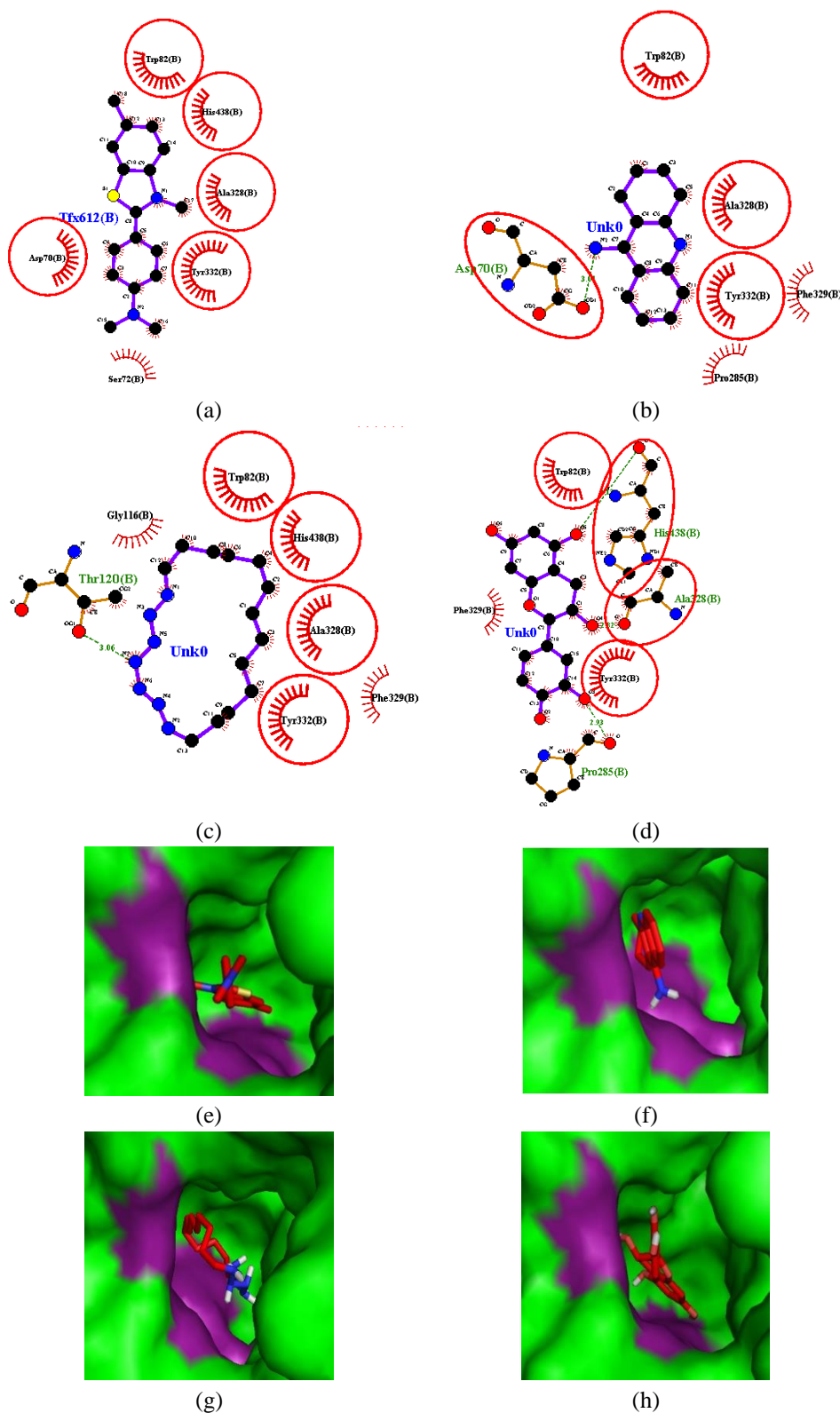
Keterangan : R = 1,986 kal·mol⁻¹·K⁻¹ dan T = 298K.

Energi bebas pengikatan akan mencapai setimbang apabila bernilai negatif. Energi bebas pengikatan berbanding lurus dengan Konstanta inhibisi. Semakin besar nilai negatif pada ΔG ikatan suatu senyawa, maka kemampuan untuk berinteraksi dengan reseptor target akan semakin spontan. Sehingga, semakin rendah konstanta inhibisi suatu senyawa akan memperkecil konsentrasi yang dibutuhkan suatu senyawa untuk menghambat kerja enzim, begitu pula sebaliknya (Du *et al.*, 2016). Menurut Zheng and Polli (2010) Konstanta inhibisi dapat dinyatakan kuat apabila memiliki nilai ≤ 100 μM , dan sebaliknya, konstanta inhibisi dapat dinyatakan lemah apabila memiliki nilai ≥ 100 μM .

Dapat dihasilkan bahwa ligan uji yang memiliki energi bebas pengikatan terendah dan Konstanta inhibisi terendah yaitu *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* sebesar -8,6 kkal·mol⁻¹ dan 0,4888 μM . Sementara itu dapat diketahui pula seluruh ligan uji yang dianalisis tersebut menyatakan bahwa semua ligan berada pada Konstanta inhibisi yang tergolong kuat, yang artinya ligan uji tersebut berpotensi dalam menghambat enzim BChE secara kuat. Selain dari kedua faktor tersebut, jumlah ikatan hidrogen dan jumlah interaksi hidrofobik juga menjadi parameter analisis *docking*. Parameter tersebut menjadi acuan dalam menemukan kandidat obat. Semakin banyak jumlah ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik pada suatu kompleks ligan-reseptor, maka konformasi kedua struktur akan semakin stabil, kuat, serta meningkatkan pengikatan antarmuka kompleks ligan-reseptor dan meningkatkan aktivitas biologis dalam merancang kandidat obat (Patil *et al.* 2010).

Hasil ini dapat dinyatakan bahwa *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dan *Catechin* memiliki energi bebas pengikatan bernilai negatif, memiliki dua interaksi secara bersamaan yaitu ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Gambar 3). Adapun jika dibandingkan dengan *Thioflavin T 612* (ligan alami) dan *Tacrine* (ligan pembanding), *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dan *Catechin* lebih memiliki keunggulan dari masing-masing parameter tersebut, tetapi interaksi hidrofobik di antara ligan *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dengan *Thioflavin T 612* memiliki jumlah yang sama yaitu enam. Secara keseluruhan, ligan uji dominan memiliki jumlah interaksi hidrofobik yang lebih banyak dibandingkan jumlah ikatan hidrogen (Tabel 5).

Salah satu analisis hasil visualisasi *docking* dapat digunakan secara dua dimensi adalah menggunakan program *LigPlot+* v.2.2.4. Adanya program *LigPlot+* v.2.2.4 bertujuan mempelajari kesamaan interaksi pengikatan enzim target dengan ligan sebagai agen potensial dan penghambat enzim (Mishra and Dey 2019). Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh ligan berada pada target pengikatan enzim. Adapun jarak ikatan hidrogen yang diperoleh pada penelitian berkisar pada 2,82 Å – 3,20 Å. Menurut Patil *et al.* (2010), jarak ikatan hidrogen yang terbentuk lebih dari 1,85 Å, maka dapat dinyatakan sebagai jenis ikatan hidrogen yang tergolong lemah dan mengakibatkan jenis ikatan dapat diputus atau ditukar dengan jenis ikatan lain. Dengan demikian, ikatan hidrogen yang terbentuk di antara kompleks ligan- reseptor tersebut merupakan jenis ikatan hidrogen bersifat lemah.



Gambar 3. Visualisasi dua dimensi penambatan molekuler ligan dengan reseptor enzim BChE (a) *Thioflavin T* 612 (ligan alami) (b) *Tacrine* (ligan pembanding) (c) *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* (d) *Catechin* dan visualisasi tiga dimensi penambatan molekuler ligan dengan reseptor enzim BChE (e) *Thioflavin T* 612 (ligan alami) (f) *Tacrine* (ligan pembanding) (g) *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* (h) *Catechin*.

Tabel 5. Hasil analisis energi bebas pengikatan dan konstanta inhibisi.

Ligan	Energi bebas pengikatan (kkal·mol ⁻¹)	Konstanta inhibisi (μM)	Jumlah ikatan hidrogen	Jumlah interaksi hidrofobik
<i>1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane</i>	-8,6	0,4888	1	6
<i>Anthocyanidins</i>	-7,8	1,8889	0	6
<i>Aurone</i>	-7,7	2,2366	0	6
<i>Chalcone</i>	-7,6	2,6484	0	4
<i>Quercetin</i>	-7,4	3,7131	1	6
<i>Alpha-selinene</i>	-7,3	4,3967	0	4
<i>2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol</i>	-7,2	5,2060	0	9
<i>Catechin</i>	-7,2	5,2060	3	3
<i>Thioflavin T 612</i> (ligan alami)	-7,0	7,2991	0	6
<i>Alpha-caryophyllene</i>	-6,9	8,6427	0	5
<i>Caryophyllene</i>	-6,9	8,6427	0	6
<i>Germacrene D</i>	-6,9	8,6427	0	7
<i>Tacrine</i> (ligan pembanding)	-6,8	10,2337	1	5
<i>5-amino-2-[[6-(3-carbamoyl-4-cyanophenoxy)-2-[3-(diaminomethylideneamino)phenoxy]-5-nitropyrimidin-4-yl]amino]-5-oxopentanoic acid</i>	-5,7	65,6498	2	10

KESIMPULAN

Dua senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirih merah, yaitu *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dan *Catechin*, memiliki potensi inhibisi terhadap aktivitas enzim butirilkolinesterase (BChE) berdasarkan parameter penapisan virtual, prediksi farmakokinetik, prediksi toksisitas, dan analisis terkait penambatan molekuler. *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dan *Catechin* masing-masing memiliki energi bebas ikatan sebesar -8,6 kkal·mol⁻¹ dan -7,2 kkal·mol⁻¹, serta daya inhibisi masing-masing ligan sebesar 0,4888 μM dan 5,2060 μM. Jumlah ikatan hidrogen dan jumlah interaksi hidrofobik pada *1,2,3,4,5,6,7-heptazacycloicosane* dengan BChE masing-masing sebesar 1 dan 6. Sedangkan jumlah ikatan hidrogen dan jumlah interaksi hidrofobik pada *Catechin* dengan BChE masing-masing sebesar 3 dan 3. Kedua senyawa tersebut menunjukkan interaksi yang stabil dan kuat dengan BChE dikarenakan memiliki dua jenis interaksi, yaitu ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen. Serta diketahui pula dua senyawa mengikat pada sisi substrat BChE, yaitu Tyr-332 dan Trp-82.

UCAPAN TERIMA KASIH

Riset Kolaborasi Indonesia – WCU (*World Class University*) Tahun Anggaran 2020 Nomor: 1755/IT3.L1/PN/2020/IT3.L1/PN/2020 a.n. Dr. Mega Safithri, S.Si., M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Agatonovic-Kustrin, S., Kettle, C., David, W., and Morton, D.W., 2018. A Molecular Approach in Drug Development for Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 106, 553–565. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.147>.
- Adriani., 2018. Prediksi Senyawa Bioaktif dari Tanaman Sanrego (*Lunasia amara* Blanco) sebagai Inhibitor Enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) melalui Pendekatan *Molecular Docking*. *Jurnal Ilmiah Pena*, 1(1), 6–11. <https://doi.org/10.51336/jip.v10i1.128>.
- Almasyhuri and Sundari, D., 2019. Uji Aktivitas Antiseptik Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn.) dalam Obat Kumur terhadap *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 9(1), 10–18. <https://doi.org/10.22435/jki.v9i1.351>.
- Anitha, K., Gopi, G., Girish., and Kumar, P.S., 2013. Molecular Docking Study on Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 2(5), 602–610. <https://doi.org/10.1039/c5mb00493d>.

- Astri, Y., Sitorus, T., Sigit, J.I., and Sujatno, M., 2012. Toksisitas Akut per Oral Ekstrak Etanol Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (Lour.) DC) terhadap Kondisi Lambung Tikus Jantan dan Betina Galur Wistar. *Majalah Kedokteran Bandung*, 44(1), 38–43. <http://dx.doi.org/10.15395/mkb.v44n1.71>.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Boittier, E.D., Tang, Y.Y., Buckley, M.E., Schuurs, Z.P., Richard, D.J., and Gandhi, N.S., 2020. Assessing Molecular Docking Tools to Guide Targeted Drug Discovery of CD38 Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21155183>.
- Cheng, F., Yu, Y., Shen, J., Yang, L., Li, W., Liu, G., Lee, P.W., and Tang, Y., 2011. Classification of Cytochrome P450 Inhibitors and Noninhibitors Using Combined Classifiers. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(5), 996–1011. <https://doi.org/10.1021/ci200028n>.
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P.W., and Tang, Y., 2012. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(11), 3099–3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>.
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., and Vasic, V.M., 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. doi: 10.2174/1570159X11311030006. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>.
- Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V., 2017. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- Dalai, M.K., Bhadra, S., Bandyopadhyay, A., and Mukherjee, P.K., 2013. Evaluation of Anti-cholinesterase Activity of the Standardized Extract of *Piper betel* L. leaf. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 14, 31–35. <https://doi.org/10.1007/s13596-013-0141-3>.
- Dallakyan, S. and Olson, A.J., 2015. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.
- Darvesh, S., 2016. Butyrylcholinesterase as A Diagnostic and Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 13(9), 1–5. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160404120542>.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y., Ai, S., Liang, J., Sang, J., Ji, X., and Liu, S., 2016. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.
- Fadlilah, M., 2015. Benefit of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) as Antibiotics. *J Majority*, 4(3), 71–75. <https://doi.org/10.31983/jkg.v7i2.6258>.
- Farhan, M., 2019. Penambatan Molekuler Senyawa Aktif Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) pada α -Glukosidase sebagai Kandidat Obat Antidiabetes Melitus [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Fatmawaty., Anggreni, N.G.M., Fadhil, N., and Prasasty, V.D., 2019. Potential In Vitro and In Vivo Antioxidant Activities from *Piper crocatum* and *Persea americana* leaf extracts. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 12(2), 661–667. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1686>.
- Fikrika, H., Ambarsari, L., and Sumaryada, T., 2016. Molecular Docking Studies of Catechin and Its Derivates as Anti-bacterial Inhibitor for Glucosamine-6-Phosphate Synthase. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 31, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/31/1/012009>.
- Halova, A., Janoutova, J., Ewerlingova, L., Janout, V., Bonczek, O., Zeman, T., Gerguri, T., Balcar, V.J., and Sery, O., 2018. CHAT Gene Polymorphisms 3810950 is Associated with the Risk of Alzheimer's Disease in the Czech Population. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0444-2>.
- Hasanah, M.I., 2017. Potensi Antibakteri Kurkuminoid dan Nanokurkuminoid Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) secara *In Silico* dan *In Vitro*. [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ibrohim, M.S.M., 2015. Inhibisi Senyawa Bahan Alam pada Protein Antiapoptosis Sel Kanker Pankreas melalui Pendekatan *In Silico* [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Jasiecki, J. and Wasąg, B., 2019. Butyrylcholinesterase Protein Ends in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease— Could *BCHE* Genotyping be Helpful in Alzheimer's Therapy?. *Biomolecules*, 9(10), 1–7. <https://doi.org/10.3390/biom9100592>.
- Jeniossa, J.A., 2018. Penambatan Molekuler Senyawa Kurkuminoid, Xanthorizol, β -Elemenon, Zedoaron terhadap Aktivitas Inhibisi Enzim Dipeptidyl Peptidase IV [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Kelutur, F.J., Mustarichiea, R., and Umar, A.K., 2020. *Virtual screening* Kandungan Senyawa Kipas Laut (*Gorgonia mariae*) sebagai Antiasma. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 16(2), 199–210. <http://dx.doi.org/10.20961/alchemy.16.2.3996.199-210>.
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Menkes: Lansia yang Sehat, Lansia yang Jauh dari Demensia. <<https://www.kemkes.go.id/article/view/16031000003/menkeslansia-yang-sehat-lansia-yang-jauh-dari-demensia.html>> (diakses pada 18 Agustus 2021).
- Khan, T., Ahmad, R., Azad, I., Raza, S., Joshi, S., and Khan, A.R., 2018. Computer-aided Drug Design and Virtual Screening of Targeted Combinatorial Libraries of Mixed Ligand Transition Metal Complexes of 2-butanone thiosemicarbazone. *Computational Biology and Chemistry*, 75, 178–195. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.05.008>.
- Khoury, T., Rmeileh, A.A., Yosha, L., Benson, A.A., Daher, S., and Mizrahi, M., 2015. Drug Induced Liver Injury: Review with a Focus on Genetic Factors, Tissue Diagnosis, and Treatment Options. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3(2), 99–108. <https://doi.org/10.14218/jcth.2015.00007>.
- Kumar, A., Pintus, F., Petrillo, A.D., Medda, R., Caria, P., Matos, M.J., Vina, D., Pieroni, E., Delogu, F., Era, B., Delogu, G.L., and Fais, A., 2018. Novel 2-phenylbenzofuran Derivatives as Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22747-2>.
- Lamothe, S.M., Guo, J., Li, W., Yang, T., and Zhang, S., 2016. The Human Ether-a-go related Gene (hERG) Potassium Channel Represent an Unusual Target for Protease-mediated Damage. *Journal of Biological Chemistry*, 291(39), 20387–20401. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.743138>.
- Lee, H., Yu, M., Kazmi, S.R., Oh, S.Y., Rhee, K.H., Bae, M., Lee, B.H., Shin, D., Oh, K., Ceong, H., Lee, D., and Na, D., 2019. Computational Determination of hERG-related Cardiotoxicity of Drug Candidates. *BMC Bioinformatics*, 20(250), 67–73. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2814-5>.
- Li, X., Chen, L., Cheng, F., Wu, Z., Bian, H., Xu, C., and Li, W., 2014. *In silico* Prediction of Chemical Acute Oral Toxicity Using Multi-Classification Methods. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54, 1061–1069. <https://doi.org/10.1021/ci5000467>.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J., 2001. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Reviews*, 46, 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- Lister, I.N.E., Viany, R.D., Nasution, A.N., Zein R., Manjang, Y., and Munaf, E., 2014. Lister INE, Viany RD, Nasution AN, Zein R, Manjang Y, Munaf E. 2014. Antimicrobial Activities of Methanol Extract of Sirih Merah (*Piper crocatum* L.) L. Leaf. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(12), 650–654.
- Macdonald, I.R., Maxwell, S.P., Reid, G.A., Cash, M.K., Drew, R., DeBay, D.R., and Darvesh, S., 2017. Quantification of Butyrylcholinesterase Activity as a Sensitive and Specific Biomarker of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(2), 491–505. <https://doi.org/10.3233/jad-170164>.
- Masson, P., Carletti, E., and Nachon, F., 2009. Structure, Activities and Biomedical Applications of Human Butyrylcholinesterase. *Protein & Peptide Letters*, 16(10), 1215-1224. <https://doi.org/10.2174/092986609789071207>.
- Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M., and Cui, M., 2011. Molecular Docking: a Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.
- Mishra, A. and Dey, S., 2019. Molecular Docking Studies of a Cyclic-Octapeptide Cyclosaplin from Sandalwood. *Biomolecules*, 9(11), 1-18. <https://doi.org/10.3390/biom9110740>.
- Moriguchi, I., Hirono, S., Nakagome, I., and Hirano, H., 1994. Comparison of Reliability of log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(4), 976–978. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.42.976>.
- Novriadi, H., Masaenah, E., and Ramadhan, R., 2020. Penapisan Molekuler Kandidat Obat Sintetik Tuberkulosis terhadap Protein Tirosin Kinase *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Farmamedika*, 5(2), 60–69. <https://doi.org/10.47219/ath.v5i2.104>.
- Ochieng, P.J., Sumaryada, T., and Okun, D., 2017. Molecular Docking and Pharmacokinetic of Herbal Derivatives as Maltase Glucoamylase Inhibitor. *Asian Journal of Pharmaceutical and Cilinical Research*, 10(9), 392–398. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i9.19337>.
- Parfati, N. and Windono, T., 2016. Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Kajian Pustaka Aspek Botani, Kandungan Kimia, dan Aktivitas Farmakologi. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 1(1), 106-115. <https://doi.org/10.24123/mpi.v1i2.193>.

- Pasupa, K., 2012. The Review of Virtual Screening Techniques. *KMITL Information Technology Journal*, 1(1), 1–23.
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., and Varma, A.K., 2010. Optimized Hydrophobic Interaction and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. *PLoS ONE*, 5(8), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>.
- Paudel, P., Seong, S.H., Zhou, Y., Ha, M.T., Min, B.S., Jung, H.A., and Choi, J.S., 2019. Arylbenzofurans from the Root Bark of *Morus alba* as Triple Inhibitors of Cholinesterase, β -site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1, and Glycogen Synthase Kinase-3 β : Relevance to Alzheimer's Disease. *ACS Omega*, 4, 6283–6294. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00198>.
- Perdana, S., 2018. Analisis *In Silico* Interaksi Molekuler Senyawa Fenolik dari Biji Mangga pada Enzim Aldose Reductase [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pratama, R., 2015. Penambatan Molekuler Senyawa Aktif Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan Enzim COX-2 sebagai Kandidat Obat Anti Kanker Payudara [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Prayoga, G.R., 2021. Aktivitas Antikanker Payudara Senyawa Aktif Asal Batang *Spatholobus suberectus* secara *In Silico* [skripsi]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Rachmania, R.A., Supandi., and Larasati, O.A., 2015. Analisis In-Silico Senyawa Diterpenoid Lakton Herba Sambiloto (*Andrographis paniculate* Nees) pada Reseptor Alpha-Glucosidase sebagai Antidiabetes tipe II. *Pharmacy*, 12(2), 210-222.
- Rachmania, R.A., Supandi., and Cristina, F.A.D., 2016. Analisis Penambatan Molekuler Senyawa Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Reseptor α -Glukosidase sebagai Antidiabetes. *Pharmacy*, 13(2), 239–251.
- Ramadani F., 2018. Aktivitas Antioksidan, Total Tanin Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Identifikasi dengan LC-MS [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rosenberry, T.L., Brazzolotto, X., Macdonald, I.R., Wandhammer, M., Trovaslet-Leroy, M., Darvesh, S., and Nachon, F., 2017. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: a Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules*, 22(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>.
- Safithri, M., Kurniawati, A., and Syaefudin., 2016. Formula of *Piper crocatum*, *Cinnamomum burmanii*, and *Zingiber officinale* Extracts as a Functional Beverage for Diabetics. *International Food Research Journal*, 23(3), 1123–1130.
- Sahoo, M., Jena, L., Daf, S., and Kumar, S., 2016. Virtual Screening for Potential Inhibitors of NS3 Protein of Zika Virus. *Genomics & Informatics*, 14(3), 104-111. <https://doi.org/10.5808/GI.2016.14.3.104>.
- Salsabila, S.D., 2019. Penambatan Molekuler Katekin, Kaempferol, dan Kuersetin terhadap Aktivitas Inhibisi Protein Tirosin Fosfatase 1B [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sari, I.W., Junaidin., and Pratiwi, D., 2020. Studi Molecular Docking Senyawa Flavonoid Herba Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) pada Reseptor α -Glukosidase sebagai Antidiabetes Tipe 2. *Jurnal Farmagazine*, 7(2), 54-60. <http://dx.doi.org/10.47653/farm.v7i2.194>.
- Sasmito, W.A., Wijayanti, A.D., Fitriana, I., and Sari, P.W., 2015. Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal pada Mencit Berdasarkan *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2), 234–239. <https://doi.org/10.22146/jsv.17924>.
- Septiani, R., 2017. Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai Antioksidan dengan Metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Setiawan, B., Zarqya, I., Putro, S., and Khasanah, F., 2019. The Effect of Red Betel Leaf's Essential Oil (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) against Third Instar *Aedes aegypti* larvae. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 13(4), 1162–1165.
- Shityakov, S. and Forster, C., 2014. In Silico Structure-Based Screening of Versatile P-Glycoprotein Inhibitors using Polynomial Empirical Scoring Functions. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.2147/aabc.s56046>.
- Suri, M.A., Azizah, Z., and Asra, R., 2021. A Review : Traditional Use, Phytochemical and Pharmacological Review of Red Betel Leaves (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(1), 159–163. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v9i1.926>.
- Syahputra, G., Ambarsari, L., and Sumaryada, T., 2014. Simulasi Docking Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*, 10(1), 55–67.

- Tallei, T.E., Tumilaar, S.G., Niode, N.J., Fatimawali., Kepel, B.J., Idroes, R., and Effendi, Y., 2020. Potential of Plant of Bioactive Compound as SARS-CoV-2 Main Protease (M^{pro}) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. *Scientifica*, 2020, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2020/6307457>.
- Tsuno, N., 2009. Donepezil in the Treatment of Patients with Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9(5), 591–598. <https://doi.org/10.1586/ern.09.23>.
- Vijesh, A.M., Isloor, A.M., Telkar, S., Arulmoli, T., and Fun, H., 2013. Molecular Docking Studies of Some New Imidazole Derivatives for Antimicrobial Properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 6, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.10.007>.
- Wedaswari, I.A.I., 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Metode Rancimat dan Identifikasi dengan LC-MS [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [WHO] World Health Organization. 2020. Dementia. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>> (diakses pada 9 Juli 2021).
- Yang, H., Sun, L., Li, W., Liu, G., and Tang, Y., 2018. *In Silico* Prediction of Chemical Toxicity for Drug Design Using Machine Learning Methods and Structural Alerts. *Frontiers in Chemistry*, 6(30), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00030>.
- Yang, H., Du, C., Li, Q., Chen, T., Lua, X., Li, Q., Feng, F., Chen, Y., Liu, W., and Sun, H., 2019. Discovery, Molecular Dynamic Simulation and Biological Evaluation of Structurally Diverse Cholinesterase Inhibitors with New Scaffold through Shape-Based Pharmacophore Virtual Screening. *Bioorganic Chemistry*, 92, 103294. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103294>.
- Yusriani, M., 2019. Penapisan Senyawa Aktif Mahkota Dewa, Lidah Buaya, dan Pare sebagai Inhibitor Enzim Aldehid Dehidrogenase 1A3 secara *In Silico* [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Zhang, L., Ai, H., Chen, W., Yin, Z., Hu, H., Zhu, J., Zhao, J., Zhao, Q., and Liu, H., 2017. CarcinoPred-EL: Novel Models for Predicting the Carcinogenicity of Chemicals Using Molecular Fingerprints and Ensemble Learning Methods. *Scientific Report*, 7(2118), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02365-0>.
- Zhang, Z., Fan, F., Luo, W., Zhao, Y., and Wang, C., 2020. Molecular Dynamics Revealing a Detour-Forward Release Mechanism of Tacrine: Implication for the Specific Binding Characteristics in Butyrylcholinesterase. *Frontiers in Chemistry*, 8.730. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00730>.
- Zheng, X. and Polli, J., 2010. Identification of Inhibitor Concentrations to Efficiently Screen and Measure Inhibition *Ki* Values Against Solute Carrier Transporters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.013>.