



## Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian *In Silico* Potensi 2'-Hidroksicalkon dan Flavonol Tersubstitusi Trimetoksi sebagai Inhibitor *Main Protease* (M<sup>Pro</sup>) SARS-CoV-2

Ihsan Ikhtiarudin<sup>a\*</sup>, Neni Frimayanti<sup>a</sup>, Musyirna Rahmah Nasution<sup>a</sup>, Rabiatal Adawiyah<sup>a</sup>, Enda Mora<sup>a</sup>,  
Abdi Wira Septama<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau

Jalan Kamboja, Simpang Baru, Tampan, Pekanbaru, Riau, 28293, Indonesia

<sup>b</sup>Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN),  
Tangerang Selatan, 15314, Indonesia

\*Corresponding author: [ihsanikhtiarudin@stifar-riau.ac.id](mailto:ihsanikhtiarudin@stifar-riau.ac.id)

DOI: 10.20961/alchemy.20.1.78445.98-119

Received 1 September 2023, Revised 2 November 2023, Accepted 27 December 2023, Published 30 March 2024

### Kata kunci:

2'-hidroksicalkon;  
covid-19;  
iradiasi *microwave*;  
penambatan  
molekul;  
trimetoksiflavonol.

**ABSTRAK.** Pada penelitian ini, 2'-hidroksicalkon (C<sub>345</sub>) dan flavonol (F<sub>345</sub>) tersubstitusi trimetoksi telah disintesis menggunakan metode iradiasi *microwave* dan metode pengadukan. Struktur kedua produk telah dikarakterisasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, dan HRMS. Hasil analisis spektroskopi menunjukkan bahwa kedua produk memiliki struktur yang sesuai dengan struktur molekul target yang diharapkan. Selain itu, hasil sintesis juga menunjukkan bahwa metode iradiasi *microwave* terbukti dapat mempercepat waktu reaksi (dari 1,5-3,0 jam menjadi 3-6 menit) dan meningkatkan rendemen produk murni pada sintesis senyawa C<sub>345</sub> (55,31 %) dan F<sub>345</sub> (83,65 %). Selanjutnya, hasil *docking* menunjukkan bahwa kedua senyawa dapat membentuk ikatan hidrogen dengan beberapa residu penting pada sisi aktif dan dapat terikat pada kedua situs katalik M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 (PDB ID:6M2N), yaitu His41 dan Cys145 melalui interaksi hidrofobik dengan nilai energi bebas pengikatan yang lebih negatif (-8,95 dan -9,02 kcal/mol) dibandingkan dengan baicalein sebagai inhibitor pembanding. Hasil kajian *in silico* lainnya juga menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki profil farmakokinetik yang baik dan memiliki sifat kemiripan dengan obat berdasarkan aturan Lipinski, Ghose, Veber, Egan, dan Muegge. Selain itu, senyawa F<sub>345</sub> juga diprediksi memiliki risiko toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan baicalein.

### Keywords:

2'-  
hydroxychalcone;  
covid-19;  
microwave  
irradiation;  
molecular docking;  
trimethoxyflavonol.

**ABSTRACT. Synthesis, Structural Characterization, and In Silico Study of the Potential of 2'-Hydroxychalcone and Trimethoxy-Substituted Flavonols as Inhibitors of the Main Protease (M<sup>Pro</sup>) of SARS-CoV-2.** In this study, trimethoxy-substituted 2'-hydroxychalcone (C<sub>345</sub>) and flavonol (F<sub>345</sub>) were synthesized using microwave irradiation and stirring methods. The structure of the two products were characterized by spectroscopic analyses including UV-Vis, FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and HRMS. The result of spectroscopic analyses showed that the products had structures consistent with the expected target molecules. In addition, the synthesis results showed that the microwave irradiation method was proven to speed up the reaction time (from 1.5-3.0 hours to 3-6 minutes) and increased the yield of pure product in the synthesis of compounds C<sub>345</sub> (55.31 %) and F<sub>345</sub> (83.65 %). Furthermore, the docking result showed that the two compounds can form hydrogen bonds with several important residues on the active site and also can bind to catalytic dyad of the SARS-CoV-2 M<sup>Pro</sup> (PDB ID:6M2N), namely His41 and Cys145 through hydrophobic interactions with a more negative binding free energy (-8.95 and -9.02 kcal/mol) than baicalein as a reference inhibitor. The result of *in silico* studies also showed that the two compounds exhibited good pharmacokinetic profiles and drug-likeness properties based on Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge rules. In addition, compound F<sub>345</sub> was also predicted to have a smaller toxicity risk compared to baicalein.

## PENDAHULUAN

*Coronavirus disease 2019* (COVID-19) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (WHO, 2020). Penularan virus ini berlangsung sangat cepat di seluruh dunia, hingga mencetuskan pandemi global yang dimulai sejak tahun 2020 (Cucinotta and Vanelli, 2020) hingga kemudian pada tahun 2023, *world health organization* (WHO) menyatakan berakhirnya COVID-19 sebagai darurat kesehatan masyarakat. Namun, bukan berarti penyakit ini tidak lagi menjadi ancaman global (UN, 2023).

**Cite this as:** Ikhtiarudin, I., Frimayanti, N., Nasution, M. R., Adawiyah, R., Mora, E., and Septama, A. W., 2024. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian *In Silico* Potensi 2'-Hidroksicalkon dan Flavonol Tersubstitusi Trimetoksi sebagai Inhibitor *Main Protease* (M<sup>Pro</sup>) SARS-CoV-2. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 20(1), 98-119. <https://dx.doi.org/10.20961/alchemy.20.1.78445.98-119>

Berbagai jenis vaksin maupun antivirus telah dikembangkan para peneliti di seluruh dunia untuk mengatasi COVID-19. Baru-baru ini beberapa antivirus SARS-CoV-2 seperti Paxlovid (nirmatrelvir dan ritonavir) telah disetujui oleh *food and drug administration* (FDA) untuk digunakan sebagai obat yang diberikan pada pasien COVID-19 dewasa dengan gejala ringan hingga sedang yang berisiko tinggi berkembang menjadi gejala berat (FDA, 2023). Namun, pengembangan inhibitor atau antivirus baru lainnya sebagai alternatif pengobatan tentunya masih sangat diperlukan, mengingat virus ini adalah jenis virus baru dan risiko terjadinya resistensi terhadap antivirus sudah pasti ada. Para peneliti telah melaporkan bahwa beberapa varian SARS-CoV-2 ditemukan resisten terhadap beberapa inhibitor dan antivirus yang telah digunakan secara klinis (Birnie *et al.*, 2022; Iketani *et al.*, 2023).

Pengembangan inhibitor maupun antivirus SARS-CoV-2 dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan. Salah satu pendekatan yang dapat dipilih adalah dengan menargetkan enzim *main protease* ( $M^{Pro}$ ) atau *3-chymotrypsin-like protease* ( $3CL^{Pro}$ ) SARS-CoV-2. Enzim ini berperan penting dalam proses replikasi virus SARS-CoV-2 (Gyebi *et al.*, 2021). Berdasarkan kajian *in silico*, senyawa flavonoid alami seperti flavonol dan flavon dilaporkan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sisi aktif  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 (Sekiou *et al.*, 2020). Hasil studi *in silico* lainnya terhadap enam puluh empat molekul flavonoid menunjukkan bahwa flavonoid jenis flavonol merupakan yang paling aktif dibandingkan dengan jenis flavonoid lainnya (Jo *et al.*, 2020).

Senyawa flavonoid sintetik seperti 4'-metoksi flavonol juga menunjukkan adanya potensi yang lebih baik sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  dibandingkan dengan baicalein sebagai inhibitor pembanding (Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>a</sup>). Dalam hal ini, baicalein merupakan salah satu senyawa flavonoid yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya memiliki kemampuan yang baik dalam menghambat aktivitas proteolitik  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 (Su *et al.*, 2020) secara *in vitro*. Berdasarkan hasil penelitian Su *et al.*, (2020), baicalein pada konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  menghasilkan daya hambat sebesar 99,4%, sedangkan pada konsentrasi 10  $\mu\text{M}$  menghasilkan daya hambat sebesar 87% terhadap aktivitas  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2. Berdasarkan pengujian lanjutan, baicalein mampu menghambat 50% aktivitas dari  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 pada konsentrasi 0,94  $\mu\text{M}$  dan juga menunjukkan aktivitas antivirus yang baik pada sel Vero E6 yang diinfeksi oleh SARS-CoV-2 dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 2,94  $\mu\text{M}$  dan tidak bersifat sitotoksik terhadap sel Vero E6 karena memiliki nilai  $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$ .

Beberapa flavonol lainnya seperti fisetin dan myricetin juga telah dilaporkan dapat menghambat SARS-CoV-2 terutama dengan menargetkan  $M^{Pro}$  secara non-kompetitif, dengan potensi yang sebanding dengan atazanavir sebagai kontrol positif (Chaves *et al.*, 2022). Berdasarkan penelusuran beberapa literatur di atas, sebagian besar flavonoid yang telah dilaporkan potensinya sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 baik secara *in silico* maupun *in vitro* adalah *natural flavonoid*, sedangkan potensi flavonoid sintetik sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 belum banyak yang mengkajinya. Oleh karena itu, menjadi suatu hal yang sangat menarik bagi para peneliti untuk dapat mengeksplorasi potensi aktivitas dari berbagai senyawa flavonoid sintetik sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2.

Pada penelitian ini, kami tertarik untuk melaporkan sintesis, karakterisasi struktur, dan kajian *in silico* senyawa analog 2'-hidroksicalkon dan flavonol yang mengandung tiga buah gugus metoksi pada cincin aromatik B sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 yang potensial. Sintesis kedua senyawa tersebut dengan metode pengadukan telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Dias *et al.*, 2013). Namun, aplikasi metode iradiasi *microwave* untuk sintesis kedua senyawa tersebut dan potensi keduanya sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 belum pernah dilaporkan sebelumnya. Dalam hal ini, eksplorasi potensi kedua senyawa hasil sintesis sebagai inhibitor  $M^{Pro}$  SARS-CoV-2 dilakukan dengan pendekatan komputasi melalui kajian *molecular docking* yang dilanjutkan dengan prediksi profil farmakokinetik dan risiko toksisitas dari kedua senyawa hasil sintesis tersebut.

## METODE PENELITIAN

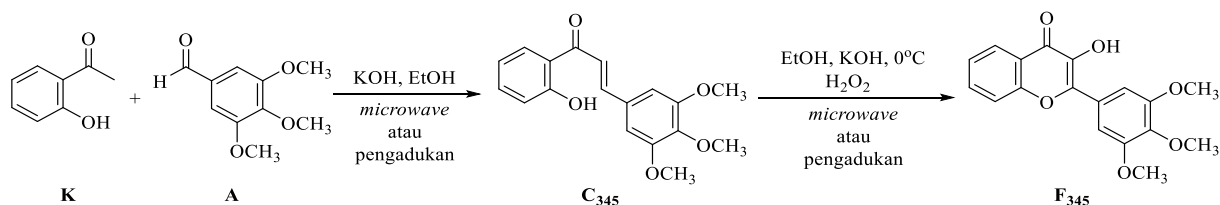
Bahan-bahan yang digunakan yaitu 2'-hidroksiasetofenon (Merck), 3,4,5-trimetoksibenzaldehid (Merck), kalium hidroksida (Merck), asam klorida pekat (Merck), hidrogen peroksida 30% (Merck), plat KLT silika gel GF 254 (Merck), indikator universal (Merck), etanol absolut (Merck), kloroform p.a. (Merck), aquades, dan beberapa pelarut teknis seperti n-heksana dan etil asetat (Brataco) yang telah didestilasi.

Alat-alat yang digunakan yaitu *monowave-200* (Anton Paar), *digital melting point* (DMP-800), HPLC (Shimadzu LC solution), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900i), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu, IR Spirit, A224158), spectrometer NMR (Jeol, 500 and 125 MHz), spectrometer massa (Waters Q-ToF MS Xevo), dan komputer LG Intel(R) Core (TM) i7-8700, CPU 3.20 GHz, RAM 8 GB yang dilengkapi dengan aplikasi

*ChemDraw Professional 15.0, Discovery Studio Visualizer (DSV) 2021 (Biovia), dan Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 (Chemical Computing Group).*

### Prosedur Sintesis, Uji Kemurnian, dan Karakterisasi Struktur Produk Hasil Sintesis

Sintesis senyawa 2'-hidroksicalkon tersubstitusi trimetoksi yaitu (*E*)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (senyawa C<sub>345</sub>) dilakukan melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt (Zamri *et al.*, 2016) dan sintesis senyawa flavonol tersubstitusi trimetoksi yaitu 3-hydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one (senyawa F<sub>345</sub>) dilakukan melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada (FAO) (Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>a</sup>) dengan memodifikasi prosedur yang telah dilaporkan oleh Dias *et al.* (2013). Sintesis kedua senyawa dilakukan dengan metode iradiasi *microwave* pada suhu 80 °C dan dibandingkan dengan metode pengadukan dengan *magnetic stirrer* pada suhu kamar. Rute sintesis kedua senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Rute sintesis senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> dengan metode iradiasi *microwave* dan pengadukan. K = 2'-hidroksiasetofenon dan A = 3,4,5-trimetoksibenzaldehid.

#### Sintesis senyawa C<sub>345</sub> dengan metode iradiasi *microwave*

Campuran 2'-hidroksiasetofenon (5 mmol; 0,68 g), 3,4,5-trimetoksibenzaldehid (5 mmol; 0,98 g), dan etanol absolut (5 mL) ditempatkan dalam tabung reaksi khusus. Kemudian larutan kalium hidroksida (4 N, 10 mL) ditambahkan ke dalam campuran reaksi tersebut. Tabung reaksi kemudian ditutup dan ditempatkan ke dalam reaktor *monowave*-200. Campuran reaksi kemudian diaduk dengan kecepatan 600 rpm dan diiradiasi *microwave* pada suhu 80 °C. Setelah itu, campuran produk dalam reaktor didinginkan hingga mencapai suhu kamar dengan bantuan kompresor alat. Jalannya reaksi dipantau melalui uji KLT menggunakan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat (8:2). Setelah reaksi dipastikan selesai, campuran produk diasamkan dengan larutan asam klorida 3 N dingin hingga pH 6, lalu didinginkan selama 24 jam dalam lemari pendingin. Endapan yang terbentuk kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman 42 dan dicuci dengan aquades dingin dan dikeringanginkan. *Crude product* kemudian direkristalisasi dengan etanol panas untuk mendapatkan produk murni.

#### Sintesis senyawa C<sub>345</sub> dengan metode pengadukan

Campuran 2'-hidroksiasetofenon (20 mmol; 2,72 g) dan 3,4,5-trimetoksibenzaldehid (20 mmol, 3,92 g) dilarutkan dalam etanol absolut (20 mL). Kemudian larutan kalium hidroksida (4 N, 40 mL) ditambahkan ke dalam campuran reaksi. Campuran kemudian diaduk dengan kecepatan 600 rpm menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu kamar. Jalannya reaksi dipantau melalui uji KLT menggunakan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat (8:2). Setelah reaksi dipastikan selesai, campuran produk diasamkan dengan larutan asam klorida 3 N dingin hingga pH 6, lalu didinginkan selama 24 jam dalam lemari pendingin dan endapan yang terbentuk kemudian disaring dengan corong Buchner, dicuci dengan aquades dingin dan n-heksana dingin, lalu dikeringanginkan. *Crude product* kemudian direkristalisasi dengan etanol panas untuk mendapatkan produk murni.

#### Sintesis senyawa F<sub>345</sub> dengan metode iradiasi *microwave*

Senyawa C<sub>345</sub> (1 mmol; 0,3141 g) disuspensikan dalam etanol absolut (4 mL), kemudian ditempatkan dalam tabung reaksi khusus. Larutan kalium hidroksida (3 N, 2 mL) ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan campuran reaksi didinginkan di dalam *freezer* hingga mencapai suhu 0 °C. Hidrogen peroksida 30% (1 mL) kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian ditutup dan ditempatkan ke dalam reaktor *monowave*-200. Campuran reaksi diaduk dengan kecepatan 600 rpm dan diiradiasi *microwave* pada suhu 80 °C. Setelah itu, campuran produk dalam reaktor didinginkan hingga mencapai suhu kamar dengan bantuan kompresor alat. Jalannya reaksi dipantau melalui uji KLT menggunakan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat (7:3). Setelah reaksi dipastikan selesai, campuran produk diasamkan dengan larutan asam klorida 3 N dingin hingga pH 6, lalu didinginkan selama 24 jam dalam lemari pendingin. Endapan yang terbentuk kemudian disaring

menggunakan kertas saring Whatman 42 dan dicuci dengan aquades dingin, lalu dikeringanginkan. Produk murni diperoleh tanpa rekristalisasi.

#### **Sintesis senyawa F<sub>345</sub> dengan metode pengadukan**

Senyawa F<sub>345</sub> dilakukan mengikuti prosedur sintesis senyawa 4'-metoksiflavanon (senyawa 4F) yang telah dilaporkan oleh (Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>a</sup>) dengan sedikit modifikasi. Kondisi reaksi lebih detail dipaparkan pada bagian hasil dan pembahasan.

#### **Pengukuran titik leleh, uji kemurnian, dan karakterisasi produk hasil sintesis**

Pengukuran titik leleh padatan senyawa hasil sintesis dilakukan menggunakan *digital melting point* (DMP-800). Prosedur detail pengukuran titik leleh dapat dilihat pada bagian **Tabel SI 1** (Lihat **Supporting Information**). Produk hasil sintesis diuji kemurniannya melalui analisis HPLC fase terbalik menggunakan kolom Shim-Pack VP-ODS dengan panjang dan diameter kolom 150 x 4,6 mm dengan memodifikasi prosedur pada penelitian sebelumnya (Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>a</sup>). Fase gerak, laju alir, waktu analisis dan panjang gelombang deteksi yang digunakan pada analisis HPLC dapat dilihat pada **Tabel SI 2**, **Tabel SI 3**, dan **Tabel SI 4** (Lihat **Supporting Information**). Struktur produk hasil sintesis yang telah dipastikan kemurniannya kemudian dikarakterisasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, dan HRMS. Data spektrum yang diperoleh kemudian diinterpretasikan dan dibandingkan dengan beberapa literatur pendukung.

Senyawa C<sub>345</sub> diperoleh dalam bentuk kristal berwarna kuning, sedangkan senyawa F<sub>345</sub> diperoleh dalam bentuk serbuk berwarna kuning pucat, sebagaimana disajikan pada **Gambar SI 1** (lihat **Supporting Information**). Kedua senyawa hasil sintesis tidak memiliki aroma khas dan memiliki jarak leleh tajam (1-2 °C), yang merupakan ciri khas dari titik leleh suatu padatan murni. Profil KLT masing-masing produk hasil sintesis menunjukkan noda tunggal dan memiliki nilai R<sub>f</sub> dan warna pendar yang berbeda dengan senyawa awalnya (2'-hidroksiasetofenon dan 3,4,5-trimetoksibenzaldehid), sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 2** dan **Gambar SI 3** (lihat **Supporting Information**). Selanjutnya, dilakukan uji KLT terhadap masing-masing senyawa hasil sintesis menggunakan beberapa jenis fase gerak. Kromatogram KLT dari masing-masing senyawa secara konsisten juga menunjukkan noda tunggal saat diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 4** dan **Gambar SI 5** (lihat **Supporting Information**). Selanjutnya, analisis HPLC dilakukan untuk memastikan kemurnian dari senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub>. Kromatogram HPLC kedua senyawa hasil sintesis menunjukkan satu puncak dominan masing-masing pada waktu retensi (t<sub>R</sub>) 21,82 menit dan 9,98 menit, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 6** dan **Gambar SI 7** (lihat **Supporting Information**). Hal ini menunjukkan bahwa kedua produk hasil sintesis memiliki kemurnian sangat baik.

#### **Prosedur Kajian *in silico* Senyawa Hasil Sintesis**

Kajian *in silico* senyawa hasil sintesis dilakukan melalui studi *molecular docking*, prediksi sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, sifat kemiripan dengan obat (*drug-likeness*), serta risiko toksisitas senyawa hasil sintesis.

#### **Redocking Baicalein dan docking Senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> ke sisi aktif M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2**

Struktur 2D ligan digambarkan menggunakan aplikasi ChemDraw Professional 2015. Struktur 3D masing-masing ligan dioptimasi dengan MOE 2022.02 (Chemical Computing Group) menggunakan *force field* MMFF94x, *fix hydrogen*, *fix charge*, dan *gradient* 0,0001. Lalu disimpan dalam format \*.mdb sebagai *database ligand*.

Struktur kristal M<sup>Pro</sup> diunduh dari situs [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (PDB ID: 6M2N). Protein tersebut terdiri dari empat *chain* (*chain* A, B, C dan D). Dalam hal ini, hanya *chain* A yang digunakan untuk *docking* mengikuti prosedur yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Mohamed *et al.*, 2021). *Chain* B, C, D, molekul air, dan ligan bawaan (baicalein) dihilangkan menggunakan aplikasi DSV 2021. Kemudian struktur protein tersebut dipreparasi lebih lanjut menggunakan aplikasi MOE 2022.02 dengan *tool QuickPrep* menggunakan *force field* CHARMM27, *gradient* 0,01, dan *potential fixed*. Struktur protein yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format \*.pdb untuk digunakan sebagai reseptor pada proses *docking*.

Asam amino yang berada pada sisi aktif protein ditandai sebagai *dummy atom* menggunakan menu *site finder* pada MOE 2022.02. Dalam hal ini, *site* yang ditandai sebagai *dummy atoms* adalah *site* 1 (Thr24, Thr25, Leu27, His41, Cys44, Thr45, Ser46, Asp48, Met49, Pro52, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Asp187, Arg188, Gln189), sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 8** (Lihat **Supporting Information**). *Force field* diatur menjadi CHARMM27. Setelah itu, masuk ke menu *dock*, lalu *dummy atoms* dipilih sebagai *site* dan *database ligand* yang telah disiapkan dipilih sebagai ligan. *Placement* dan *refinement*



*method* berturut-turut diset menjadi *Triangle Matcher* dan *Rigid Receptor*. *Placement* dan *refinement score* masing-masing diatur menjadi London dG dan GBVI/WSA dG. *Placement* dan *refinement poses* masing-masing diatur menjadi 100 dan 10, kemudian prosedur *docking* dijalankan. Setelah prosedur *docking* selesai, diperoleh hasil dalam bentuk tabel yang berisi nilai energi bebas pengikatan (S, kcal/mol) dan nilai RMSD dari 10 pose terbaik kompleks ligan-protein dalam format \*.mdb. Pose terbaik dipilih dan kompleks ligan-protein hasil *docking* kemudian disimpan dalam format PDB dan divisualisasikan menggunakan perangkat lunak DSV 2021.

#### **Prediksi sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, dan sifat kemiripan dengan obat**

Prediksi sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, dan sifat kemiripan dengan senyawa obat (*drug-likeness*) dilakukan menggunakan *website* SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) (Daina *et al.*, 2017; Jasril *et al.*, 2020).

#### **Prediksi risiko toksisitas senyawa hasil sintesis**

Prediksi risiko toksisitas dilakukan menggunakan *virtual lab* Pro-Tox-II ([https://tox-new.charite.de/protox\\_II/](https://tox-new.charite.de/protox_II/)) (Banerjee *et al.*, 2018; Jasril *et al.*, 2020).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Sintesis dan Karakterisasi Produk Hasil Sintesis**

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis senyawa 2'-hidroksicalkon (C<sub>345</sub>) dan flavonol (F<sub>345</sub>) tersubstitusi trimetoksi. Sintesis dilakukan dengan variasi 2 metode, kemudian dibandingkan dengan hasil sintesis yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Dias *et al.*, 2013). Perbandingan kondisi eksperimen dan hasil sintesis senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> pada penelitian ini dan penelitian sebelumnya masing-masing dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

**Tabel 1.** Perbandingan kondisi eksperimen dan hasil sintesis senyawa C<sub>345</sub> pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya.

Perbandingan	Metode sintesis C <sub>345</sub> pada penelitian ini		Metode Pengadukan berdasarkan literatur (Dias <i>et al.</i> , 2013)
	Iradiasi <i>Microwave</i>	Pengadukan	
Kondisi eksperimen:			
a. Mmol <i>starting material</i>	5 mmol	20 mmol	1,22-4,88 mmol
b. Basa yang digunakan	KOH 4 N (10 mL)	KOH 4 N (40 mmol)	NaOH 3M (2-10 mL)
c. Pelarut yang digunakan	EtOH (5 mL)	EtOH (20 mL)	EtOH (1-12 mL)
d. Suhu reaksi	80 °C	Suhu kamar (~30°C)	Suhu kamar
e. Waktu reaksi	6 menit	3 jam	TD <sup>a</sup>
f. Asam yang digunakan	HCl 3 N	HCl 3 N	HCl pekat (37%)
g. pH campuran produk	6	6	2
Hasil Sintesis:			
a. Berat produk murni	0,8684 g	1,6211 g	TD <sup>a</sup>
b. Rendemen produk murni	55,31 %	25,81 %	67,9%
c. Warna padatan produk	kuning	kuning	kuning
d. Titik leleh	152-153 °C	151-153 °C	156-158 °C

<sup>a</sup> TD = Tidak Dilaporkan oleh (Dias *et al.*, 2013).

Berdasarkan Tabel 1 dan Tabel 2, dapat diamati bahwa perbedaan metode dan kondisi reaksi pada sintesis senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> menghasilkan rendemen produk yang berbeda. Metode iradiasi *microwave* telah dilaporkan memiliki beberapa kelebihan, di antaranya adalah waktu reaksi yang lebih singkat dan rendemen yang lebih baik dibandingkan dengan metode konvensional (Ikhtiarudin *et al.*, 2017). Berdasarkan Tabel 1, sintesis senyawa C<sub>345</sub> dengan metode iradiasi *microwave* pada suhu 80 °C menggunakan *monowave-200* terbukti dapat mempercepat waktu reaksi dari yang semula berlangsung dalam hitungan jam (3 jam) menjadi hitungan menit (6 menit). Rendemen produk murni yang dihasilkan dari metode iradiasi *microwave* pada penelitian ini juga lebih besar dibandingkan dengan rendemen yang dihasilkan dari metode pengadukan pada penelitian ini. Namun rendemen produk murni hasil sintesis dengan metode pengadukan maupun metode iradiasi *microwave* pada penelitian ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan rendemen produk murni yang dihasilkan dari metode pengadukan yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Dias *et al.*, 2013). Hal ini dapat disebabkan kondisi reaksi yang

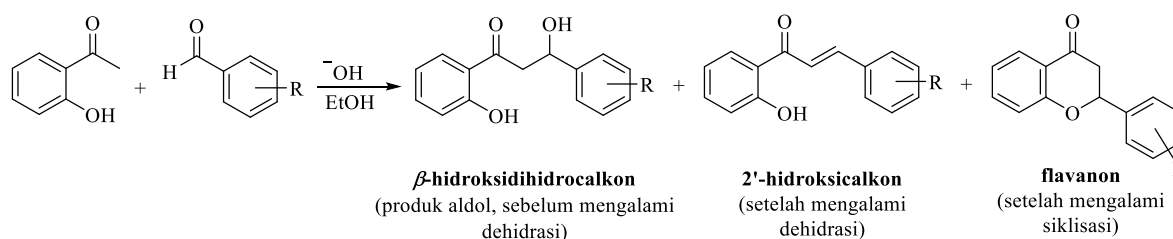
berbeda antara penelitian ini dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini, kami memodifikasi prosedur yang telah dilakukan oleh *Dias et al.*, (2013), dimana pada penelitian sebelumnya sintesis dengan metode pengadukan dilakukan dengan penambahan larutan NaOH 3 M dan pH campuran produk diasamkan hingga pH 2, sedangkan pada penelitian ini, metode pengadukan dilakukan dengan penambahan KOH 4 N dan pH campuran produk diasamkan hingga pH 6.

Berdasarkan penelitian *Zamri et al.*, (2016), rendahnya rendemen produk pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon dapat disebabkan oleh pembentukan beberapa produk samping. Peningkatan suhu reaksi akibat peningkatan daya iradiasi *microwave* pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon menggunakan *microwave* rumahan (*domestic microwave*) menyebabkan jalannya reaksi menjadi tidak terkontrol, sehingga dapat menyebabkan terbentuknya beberapa produk samping seperti senyawa flavanon dan beberapa produk samping lainnya yang belum dapat diidentifikasi. Dalam hal ini, produk samping seperti flavanon dapat terbentuk akibat terjadinya reaksi siklisasi antara gugus hidroksi (2'-OH) dan karbon  $\beta$  pada senyawa analog calkon tersebut dalam suasana basa. Sebaliknya, iradiasi *microwave* dengan daya yang terlalu rendah ternyata juga menyebabkan reaksi dehidrasi produk aldol ( $\beta$ -hidroksidihidroalkon) menjadi lebih sulit terjadi. Akibatnya, rendemen analog 2'-hidroksicalkon yang diperoleh menjadi lebih rendah. Beberapa kemungkinan struktur produk yang dapat terbentuk pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon disajikan pada **Gambar 2**.

**Tabel 2.** Perbandingan kondisi eksperimen dan hasil sintesis senyawa F<sub>345</sub> pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya.

Perbandingan	Metode sintesis F <sub>345</sub> pada penelitian ini		Metode Pengadukan berdasarkan literatur ( <i>Dias et al.</i> , 2013)
	Iradiasi <i>Microwave</i>	Pengadukan	
Kondisi eksperimen:			
a. Mmol <i>starting material</i>	2 mmol	4 mmol	0,44-1,10 mmol
b. Basa yang digunakan	KOH 3 N (4 mL)	KOH 3 N (8 mL)	NaOH 4M (120-300 $\mu$ L)
c. Pelarut yang digunakan	EtOH (8 mL)	EtOH (16 mL)	MeOH (0,2-2,0 mL)
d. Oksidator yang digunakan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (2 mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (4 mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (151-430 $\mu$ L)
e. Suhu reaksi	80 °C	Suhu kamar (~30°C)	Suhu kamar
f. Waktu reaksi	3 menit	1,5 jam	TD <sup>a</sup>
g. Asam yang digunakan	HCl 3 N	HCl 3 N	HCl pekat (37%)
h. pH campuran produk	6	6	2
Hasil Sintesis:			
a. Berat produk murni	0,5488 g	0,6629 g	TD <sup>a</sup>
b. Rendemen produk murni	83,65 %	50,52%	39%
c. Warna padatan produk	kuning pucat	kuning pucat	kuning pucat
d. Titik leleh	180-181 °C	182-183 °C	179-181 °C

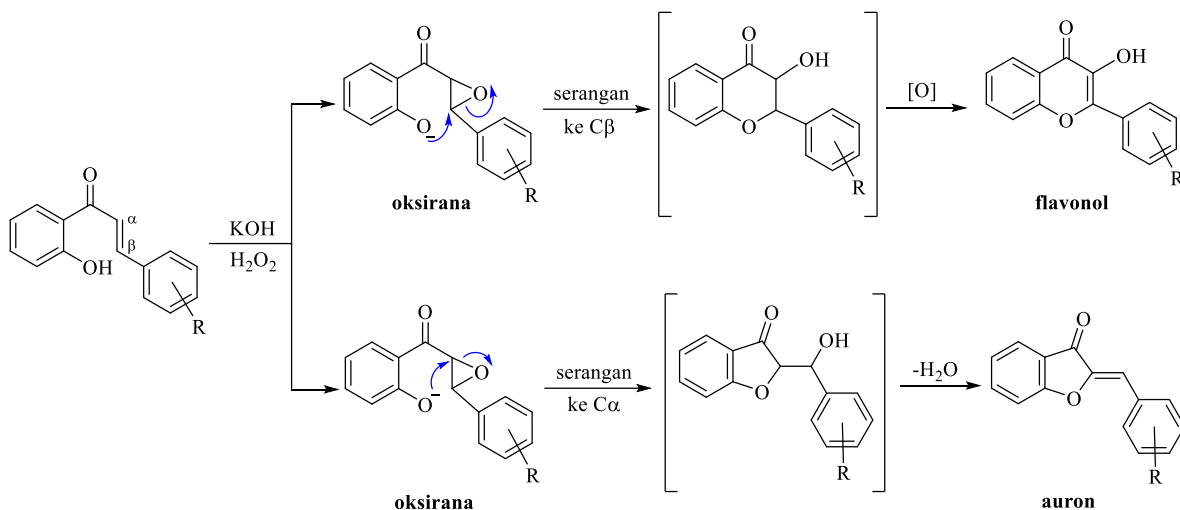
<sup>a</sup> TD = Tidak Dilaporkan oleh (*Dias et al.*, 2013).



**Gambar 2.** Beberapa kemungkinan struktur produk yang dapat terbentuk pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon.

Berdasarkan **Tabel 2**, dapat diamati bahwa modifikasi terhadap prosedur sintesis pada penelitian sebelumnya berhasil mempersingkat waktu reaksi dan meningkatkan rendemen produk senyawa F<sub>345</sub>. Sintesis senyawa F<sub>345</sub> dengan metode iradiasi *microwave* pada suhu 80 °C menggunakan *monowave-200* selain terbukti dapat mempercepat waktu reaksi dari yang semula dalam hitungan jam (1,5 jam) menjadi hitungan menit (3 menit), juga menghasilkan rendemen produk murni dengan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode

pengadukan, baik metode pengadukan yang dilaporkan pada penelitian ini maupun metode pengadukan yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Dias *et al.*, 2013). Rendahnya rendemen flavonol yang dihasilkan pada sintesis dengan metode pengadukan ini dapat disebabkan oleh pembentukan produk samping seperti auron dan flavanonol (Bennett *et al.*, 1996). Dalam hal ini, senyawa flavonol terbentuk apabila anion fenolat menyerang karbon  $\beta$  oksirana, sedangkan senyawa auron dapat terbentuk apabila anion fenolat menyerang karbon  $\alpha$  oksirana pada saat terjadinya siklisasi ataupun pembentukan cincin C. Beberapa kemungkinan struktur produk yang mungkin terbentuk pada sintesis flavonol disajikan pada Gambar 3.

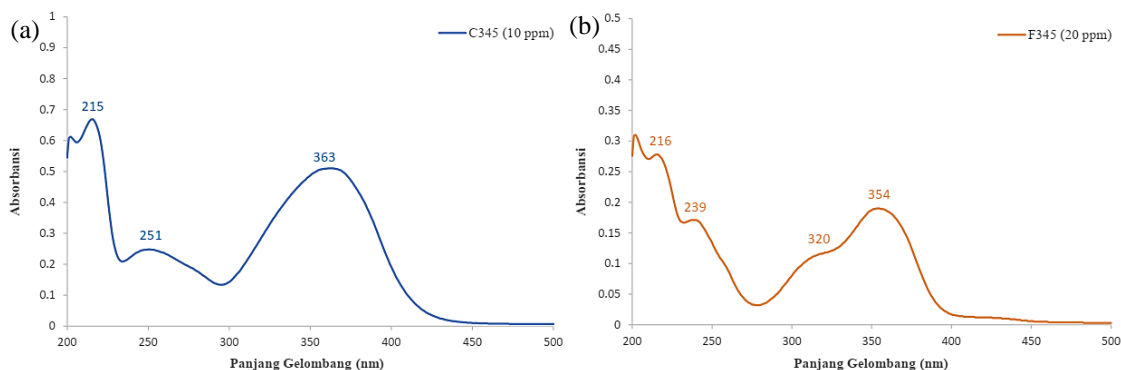


**Gambar 3.** Beberapa kemungkinan struktur produk yang mungkin terbentuk pada sintesis flavonol.

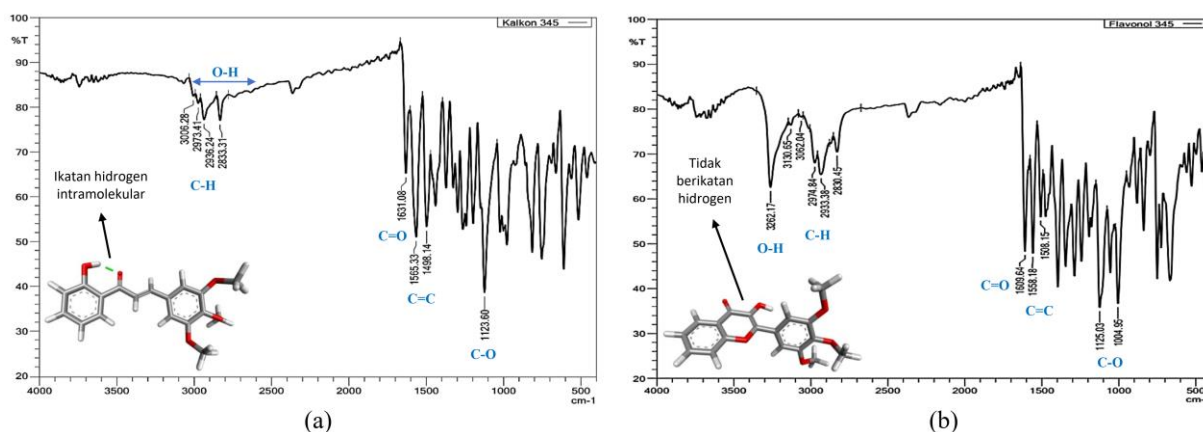
Karakterisasi struktur kedua senyawa hasil sintesis selanjutnya dilakukan melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, dan HRMS. Spektrum UV-Vis senyawa  $\text{C}_{345}$  murni pada konsentrasi 10 ppm dalam pelarut metanol memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 363, 251, dan 215 nm, masing-masing dengan absorbansi 0,510; 0,248; dan 0,668, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4(a). Serapan pada panjang gelombang 363 dan 251 tersebut masuk pada rentang serapan pita I dan II senyawa calkon. Berdasarkan literatur, pita I yang dihasilkan oleh sistem konjugasi sinamoil yang terdapat pada struktur calkon berada pada rentang 340 – 390 nm, sedangkan pita II yang dihasilkan oleh sistem konjugasi benzoil yang terdapat pada struktur calkon berada pada rentang 230 – 270 nm (Markham, 1988). Selanjutnya, hasil pengukuran spektrum UV-Vis senyawa  $\text{F}_{345}$  pada konsentrasi 20 ppm dalam pelarut metanol diperoleh panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 354, 320, 239 dan 216 nm, masing-masing dengan absorbansi 0,190; 0,117; 0,171; dan 0,278, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4(b). Serapan pada panjang gelombang 354 nm tersebut masuk pada rentang serapan pita I senyawa flavonol. Berdasarkan literatur, pita I yang dihasilkan oleh sistem konjugasi sinamoil yang terdapat pada struktur flavonol dengan gugus 3-OH bebas berada pada rentang 350 – 385 nm, sedangkan pita II yang dihasilkan oleh sistem konjugasi benzoil yang terdapat pada struktur flavonol dengan gugus 3-OH bebas berada pada rentang 250 – 280 nm (Markham, 1988). Dalam hal ini, serapan pita II dari senyawa  $\text{F}_{345}$  yang muncul pada 239 nm tidak masuk pada rentang tersebut, sehingga untuk memastikan strukturnya diperlukan analisis spektroskopi lainnya.

Pengukuran spektrum FT-IR kemudian dilakukan untuk memastikan apakah jenis ikatan maupun gugus fungsi yang terdapat pada kedua produk hasil sintesis sesuai dengan jenis ikatan dan gugus fungsi yang terdapat pada molekul target. Hasil pengukuran spektrum FT-IR senyawa  $\text{C}_{345}$  dan  $\text{F}_{345}$  menunjukkan beberapa kemiripan jenis vibrasi yang muncul. Pada spektrum FT-IR kedua senyawa sama-sama dapat diamati munculnya pita serapan dari ikatan C-H aromatik dan C-H metoksi, pita serapan C=O terkonjugasi, C=C aromatik, dan C-O alkohol dan eter, sebagaimana disajikan pada Gambar 5. Spektrum FT-IR kedua senyawa ini juga menunjukkan perbedaan dalam hal bilangan gelombang, bentuk sinyal, dan intensitas serapan yang dihasilkan oleh gugus O-H yang terdapat pada kedua senyawa hasil sintesis. Pita serapan vibrasi regang dari gugus O-H senyawa  $\text{F}_{345}$  dapat teramati dengan jelas pada bilangan gelombang 3262, dengan bentuk sinyal runcing pada bagian ujung, dan memiliki intensitas serapan medium, yang menunjukkan bahwa antara gugus 3-OH *chromen* dengan gugus karbonil tidak terbentuk ikatan hidrogen, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 5(b). Namun, pita serapan gugus O-H senyawa

C<sub>345</sub> tidak teramati dengan jelas karena memiliki bentuk sangat melebar dengan intensitas yang sangat lemah, serta muncul pada rentang bilangan gelombang 3100 – 2500, sehingga tumpang tindih dengan pita serapan C-H aromatik dan alifatik, sebagaimana dapat dilihat pada [Gambar 5\(a\)](#). Hal ini dikarenakan gugus O-H pada senyawa 2'-hidroksicalkon dapat membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonilnya secara meluas. Hal yang sama juga dapat diamati pada spektrum IR 2'-hidroksicalkon pada *online database* ([Chemical Books, 2023](#)). Penjelasan ini juga didukung oleh ([Supratman, 2010](#)) yang menyatakan bahwa terjadinya ikatan hidrogen secara meluas pada gugus O-H akan menyebabkan melebarnya pita serapan gugus O-H tersebut.



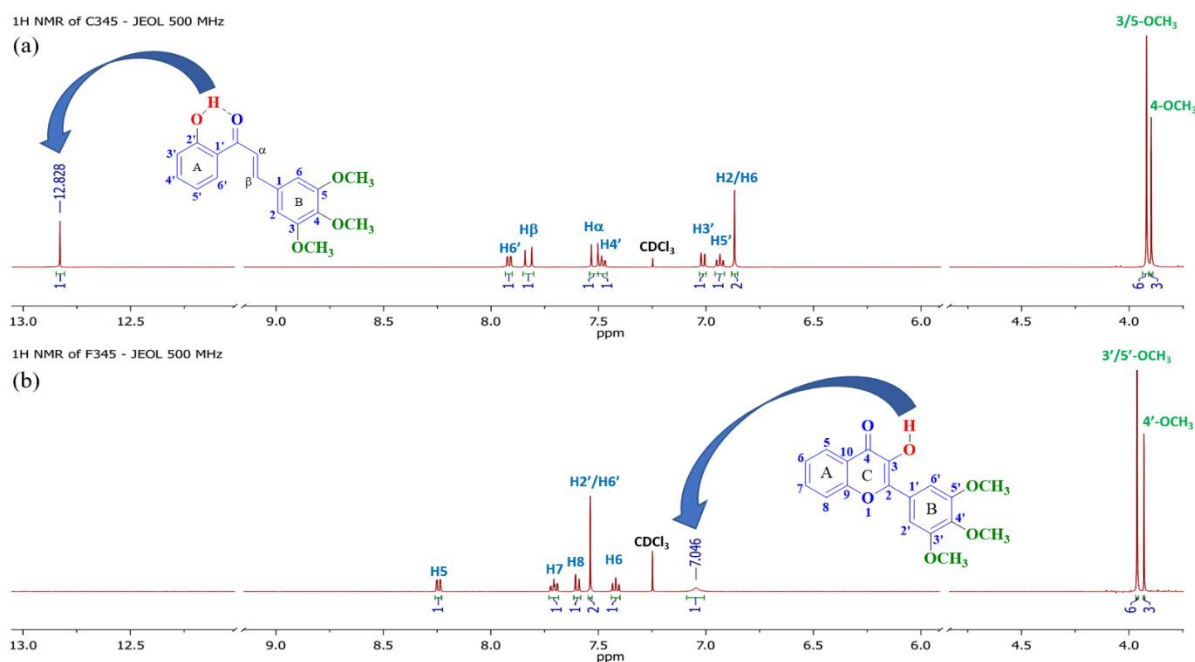
**Gambar 4.** Spektrum UV-Vis produk hasil sintesis diukur dalam metanol, (a) spektrum UV-Vis senyawa C<sub>345</sub>, (b) spektrum UV-Vis senyawa F<sub>345</sub>.



**Gambar 5.** Spektrum FT-IR produk hasil sintesis, (a) spektrum FT-IR senyawa C<sub>345</sub>, (b) spektrum FT-IR senyawa F<sub>345</sub>. Visualisasi struktur 3D senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> dilakukan menggunakan DSV 2021, setelah sebelumnya dilakukan *energy minimize* terhadap struktur kedua senyawa menggunakan MOE 2022.02.

Berdasarkan beberapa literatur, kehadiran ikatan hidrogen intramolekuler antara gugus OH dengan gugus C=O pada senyawa 2'-hidroksicalkon dapat diamati dengan jelas melalui analisis spektroskopi <sup>1</sup>H NMR dalam pelarut CDCl<sub>3</sub>. Dalam hal ini, sinyal proton 2'-hidroksi (2'-OH) akan jauh bergeser ke arah pergeseran kimia yang lebih besar, yaitu pada rentang pergeseran kimia 12,70 – 12,74 ppm ([Ikhtiarudin \*et al.\*, 2014](#)). Literatur lain menyebutkan bahwa sinyal 2'-OH tersebut dapat muncul pada rentang pergeseran kimia 12,08 – 14,04 ppm ([Yu \*et al.\*, 2020](#)), tergantung jenis dan posisi substituen lain yang berada di sekitarnya. *Overlay* spektrum <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> dapat dilihat pada [Gambar 6\(a\)](#) dan [Gambar 6\(b\)](#). Berdasarkan [Gambar 6](#), dapat diamati bahwa terdapat perbedaan yang sangat mencolok antara geseran kimia sinyal proton hidroksi pada senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub>. Dalam hal ini, sinyal proton 2'-OH senyawa C<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 12,83 ppm, sedangkan sinyal proton 3-OH senyawa F<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 7,06 ppm. Hal ini membuktikan bahwa jenis dan lingkungan proton hidroksi dari kedua senyawa sangat berbeda dan hal ini juga yang menyebabkan perbedaan mencolok dari bentuk pita serapan OH pada spektrum FT-IR kedua senyawa.





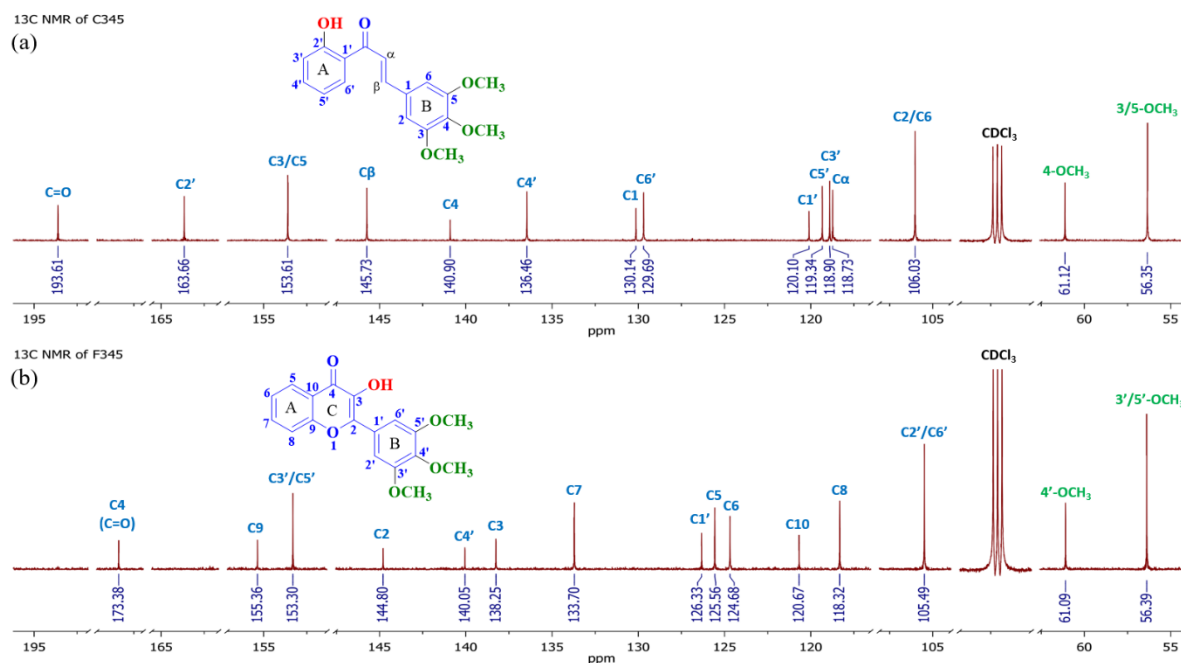
**Gambar 6.** Overlay spektrum  $^1\text{H}$  NMR (Jeol 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) produk hasil sintesis, (a) spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa  $\text{C}_{345}$ , (b) spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa  $\text{F}_{345}$ .

Berdasarkan **Gambar 6(a)**, dapat diamati bahwa sinyal proton-proton aromatik  $\text{H}_{3'}$ ,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{5'}$ , dan  $\text{H}_{6'}$  pada cincin A senyawa  $\text{C}_{345}$  berturut-turut muncul pada pergeseran kimia (ppm) 7,02 (dd, 1H,  $J_1 = 8,3$  Hz,  $J_2 = 0,8$  Hz); 7,49 (ddd, 1H,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 7,3$  Hz,  $J_3 = 1,5$  Hz); 6,94 (td, 1H,  $J_1 = J_2 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1$  Hz); dan 7,92 (dd, 1H,  $J_1 = 8,0$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz), sedangkan sinyal proton-proton aromatik  $\text{H}_2$  dan  $\text{H}_6$  pada cincin B muncul sebagai satu puncak singlet dengan integrasi 2H pada pergeseran kimia 6,87 ppm. Selanjutnya, sinyal *doublet* dari proton  $\text{H}_\alpha$  dan  $\text{H}_\beta$  pada senyawa  $\text{C}_{345}$  berturut-turut muncul pada pergeseran kimia 7,52 dan 7,83 ppm, masing-masing dengan nilai tetapan penjodohan (*coupling constant*) sebesar 15,5 Hz. Berdasarkan nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa  $\text{C}_{345}$  memiliki konfigurasi *trans* atau (*E*) (Ikhtiarudin *et al.*, 2019; Zamri *et al.*, 2016). Sinyal-sinyal yang muncul pada daerah proton aromatik senyawa  $\text{C}_{345}$  ini ditampilkan dengan lebih detail pada **Gambar S1 9** (Lihat **Supporting Information**). Selain itu, dua buah sinyal *singlet* dengan integrasi 6H dan 3H, berturut-turut pada pergeseran kimia 3,92 ppm (s, 6H) dan 3,90 ppm (s, 3H) berturut-turut merupakan sinyal dari tiga buah gugus metoksi, yaitu  $3'/5'$ - $\text{OCH}_3$  dan  $4'$ - $\text{OCH}_3$ . Penandaan sinyal-sinyal proton yang muncul pada spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa  $\text{C}_{345}$  pada **Gambar 6(a)** tersebut dilakukan dengan merujuk literatur (Silva *et al.*, 1997). Literatur tersebut memuat data pergeseran kimia proton dan karbon dari sepuluh senyawa analog  $2'$ -hidroksicalkon dan flavon dengan berbagai jenis dan posisi substituen yang didukung oleh data spektrum COSY, HECTOR, dan NOE. Pada penelitian ini, penandaan sinyal-sinyal proton tersebut dilakukan dengan membandingkan data pergeseran kimia proton-proton pada senyawa Ii yang telah dilaporkan pada literatur tersebut. Berdasarkan perbandingan yang telah dilakukan, sebagian besar nilai pergeseran kimia proton-proton pada senyawa  $\text{C}_{345}$  (pergeseran kimia yang diwarnai biru) memiliki kemiripan dengan pergeseran kimia proton-proton pada cincin A,  $\text{H}_\alpha$ ,  $\text{H}_\beta$ , dan  $2'$ -OH pada senyawa Ii (Silva *et al.*, 1997), sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar S1 10** (Lihat **Supporting Information**).

Berdasarkan **Gambar 6(b)**, juga dapat diamati bahwa sinyal proton-proton aromatik  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$  pada struktur kromen senyawa  $\text{F}_{345}$  berturut-turut muncul pada pergeseran kimia (ppm) 8,24 (dd, 1H,  $J_1 = 9,0$ ,  $J_2 = 1,5$ , Ar- $\text{H}_5$ ); 7,42 (t, 1H,  $J = 7,5$ , Ar- $\text{H}_6$ ); 7,71 (ddd, 1H,  $J_1 = 8,5$ ,  $J_2 = 7,00$ ,  $J_3 = 1,5$ , Ar- $\text{H}_7$ ); dan 7,60 (d, 1H,  $J = 8,5$ , Ar- $\text{H}_8$ ), sedangkan sinyal proton aromatik  $\text{H}_{2'}$  dan  $\text{H}_{6'}$  pada cincin fenil muncul pada pergeseran kimia 7,54 (s, 2H, Ar- $\text{H}_{2'}/\text{H}_{6'}$ ). Dengan demikian, dapat kita amati bahwa pembentukan cincin herosiklik C menyebabkan sinyal-sinyal proton pada cincin A dan B sedikit bergeser ke arah kiri (*downfield area*). Hal yang sama juga teramati pada pergeseran kimia proton metoksi yang muncul pada pergeseran kimia 3,96 (s, 6H,  $3'/5'$ - $\text{OCH}_3$ ) dan 3,93 (s, 3H,  $4'$ - $\text{OCH}_3$ ). Sedangkan sinyal proton hidroksi teramati jauh bergeser ke arah kanan (*upfield area*). Sinyal-sinyal yang muncul pada daerah proton aromatik senyawa  $\text{F}_{345}$  ini ditampilkan dengan lebih detail pada **Gambar S1 11** (Lihat **Supporting Information**). Penandaan sinyal-sinyal proton yang muncul pada spektrum  $^1\text{H}$

NMR senyawa F<sub>345</sub> pada Gambar 6(b) tersebut dilakukan dengan membandingkan data pergeseran kimia proton-proton pada penelitian ini dengan data pergeseran kimia proton pada senyawa 4F yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>9</sup>). Berdasarkan perbandingan yang telah dilakukan, pergeseran kimia proton-proton pada gugus kromen senyawa F<sub>345</sub> (pergeseran kimia yang diwarnai biru) memiliki kemiripan dengan pergeseran kimia proton-proton pada gugus kromen dan 3-OH pada senyawa 4F, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar SI 12 (Lihat *Supporting Information*).

Pengukuran spektrum <sup>13</sup>C NMR kemudian dilakukan untuk mengamati perbedaan lingkungan kimia karbon dari kedua senyawa hasil sintesis. Berdasarkan Gambar 7 dapat diamati bahwa terdapat perbedaan yang sangat mencolok antara pergeseran kimia karbon dari gugus karbonil senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub>. Dalam hal ini, sinyal karbonil senyawa C<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 193,61 ppm, sedangkan sinyal karbon dari gugus karbonil senyawa F<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 173,38 ppm. Perubahan lingkungan kimia gugus karbonil ini disebabkan oleh pembentukan cincin C dan masuknya gugus OH pada posisi C3 gugus kromen senyawa F<sub>345</sub>, yang menyebabkan gugus karbonil senyawa F<sub>345</sub> menjadi lebih terlindungi.



**Gambar 7.** Overlay spektrum <sup>13</sup>C NMR (Jeol 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) produk hasil sintesis, (a) spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa C<sub>345</sub>, (b) spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa F<sub>345</sub>

Berdasarkan Gambar 7(a), dapat diamati bahwa sinyal karbon dari 2 gugus metoksi yang terikat pada karbon C3 dan C5 senyawa C<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 56,35 ppm, sedangkan sinyal karbon dari gugus metoksi yang terikat pada karbon C4 senyawa C<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 61,12 ppm. Kemudian sinyal karbon C<sub>α</sub> dan C<sub>β</sub> senyawa C<sub>345</sub> berurutan-turut muncul pada pergeseran kimia 118,73 dan 145,73 ppm. Selanjutnya, sinyal-sinyal karbon aromatik cincin A muncul pada geseran kimia 120,10 (C1'); 163,66 (C2'); 118,90 (C3'); 136,46 (C4'); 119,34 (C5'); dan 129,69 ppm (C6'). Sedangkan sinyal-sinyal karbon aromatik cincin B muncul pada geseran kimia 130,14 (C1); 106,03 (C2/C6); 153,61 (C3/C5); dan 140,90 ppm (C4). Sinyal-sinyal yang muncul pada daerah karbon aromatik senyawa C<sub>345</sub> ini ditampilkan dengan lebih detail pada Gambar SI 13 (Lihat *Supporting Information*). Penandaan sinyal-sinyal karbon yang muncul pada spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa C<sub>345</sub> pada Gambar 7(a) tersebut telah dipastikan melalui perbandingan data pergeseran kimia karbon-karbon antara senyawa C<sub>345</sub> pada penelitian ini dengan senyawa 1i yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Silva *et al.*, 1997). Berdasarkan perbandingan yang telah dilakukan, sebagian besar data pergeseran kimia karbon-karbon pada senyawa C<sub>345</sub> (pergeseran kimia yang diwarnai biru) memiliki kemiripan dengan data pergeseran kimia karbon-karbon pada cincin A, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>, dan C=O pada senyawa 1i (Silva *et al.*, 1997), sebagaimana dapat dilihat pada Gambar SI 14 (Lihat *Supporting Information*).

Berdasarkan Gambar 7(b), dapat diamati bahwa sinyal karbon dari 2 gugus metoksi yang terikat pada C3' dan C5' senyawa F<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 56,39 ppm, sedangkan sinyal karbon dari gugus metoksi

yang terikat pada C4 senyawa F<sub>345</sub> muncul pada pergeseran kimia 61,09 ppm. Selanjutnya, sinyal-sinyal karbon pada gugus kromen (cincin A dan C) senyawa F<sub>345</sub> berturut-turut muncul pada geseran kimia 144,80 (C2); 138,25 (C3); 173,38 (C4); 125,56 (C5); 124,68 (C6); 133,70 (C7); 118,32 (C8); 155,36 (C9); dan 120,67 ppm (C10). Selanjutnya, sinyal-sinyal karbon aromatik pada cincin B senyawa F<sub>345</sub> berturut-turut muncul pada pergeseran kimia 126,33 (C1'); 105,49 (C2'/C6'); 153,30 (C3'/C5'); dan 140,05 ppm (C4'). Sinyal-sinyal yang muncul pada daerah karbon aromatik senyawa F<sub>345</sub> ini ditampilkan dengan lebih detail pada **Gambar SI 15** (Lihat *Supporting Information*). Penandaan sinyal-sinyal karbon yang muncul pada spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa F<sub>345</sub> pada **Gambar 7(b)** tersebut telah dipastikan melalui perbandingan data pergeseran kimia karbon-karbon antara senyawa F<sub>345</sub> pada penelitian ini dengan senyawa 3F yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Frimayanti *et al.*, 2023). Berdasarkan perbandingan yang telah dilakukan, sebagian besar data pergeseran kimia karbon-karbon pada senyawa F<sub>345</sub> (pergeseran kimia yang diwarnai biru) memiliki kemiripan dengan data pergeseran kimia karbon-karbon pada gugus kromen senyawa 3F, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 16** (Lihat *Supporting Information*).

Pengukuran spektrum massa resolusi tinggi kemudian dilakukan untuk memastikan berat molekul senyawa hasil sintesis telah sesuai dengan berat molekul dari molekul target. Hasil pengukuran spektrum massa resolusi tinggi dari senyawa C<sub>345</sub> dihitung sebagai C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup> = 315,1232 g/mol. Nilai *exact mass* pada spektrum HRMS senyawa C<sub>345</sub> ditemukan pada m/z 315,1241, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 17** (Lihat *Supporting Information*). Hasil pengurangan massa ditemukan dengan massa satu atom natrium diperoleh berat molekul (BM) senyawa C<sub>345</sub> yaitu 314,1163 g/mol. Selanjutnya, hasil pengukuran spektrum massa resolusi tinggi dari senyawa F<sub>345</sub> dihitung sebagai C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>Na (M+Na)<sup>+</sup> = 351,0845 g/mol. Nilai *exact mass* pada spektrum HRMS senyawa F<sub>345</sub> ditemukan pada m/z 351,0859, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar SI 18** (Lihat *Supporting Information*). Hasil pengurangan massa ditemukan dengan massa satu atom natrium diperoleh BM senyawa F<sub>345</sub> yaitu 328,0961 g/mol. Dengan demikian, berdasarkan hasil analisis spektroskopi yang telah dilakukan terhadap struktur-kedua produk dapat disimpulkan bahwa struktur produk yang diperoleh telah sesuai dengan struktur molekul target yang diharapkan.

### Kajian *in silico* produk hasil sintesis sebagai inhibitor M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2

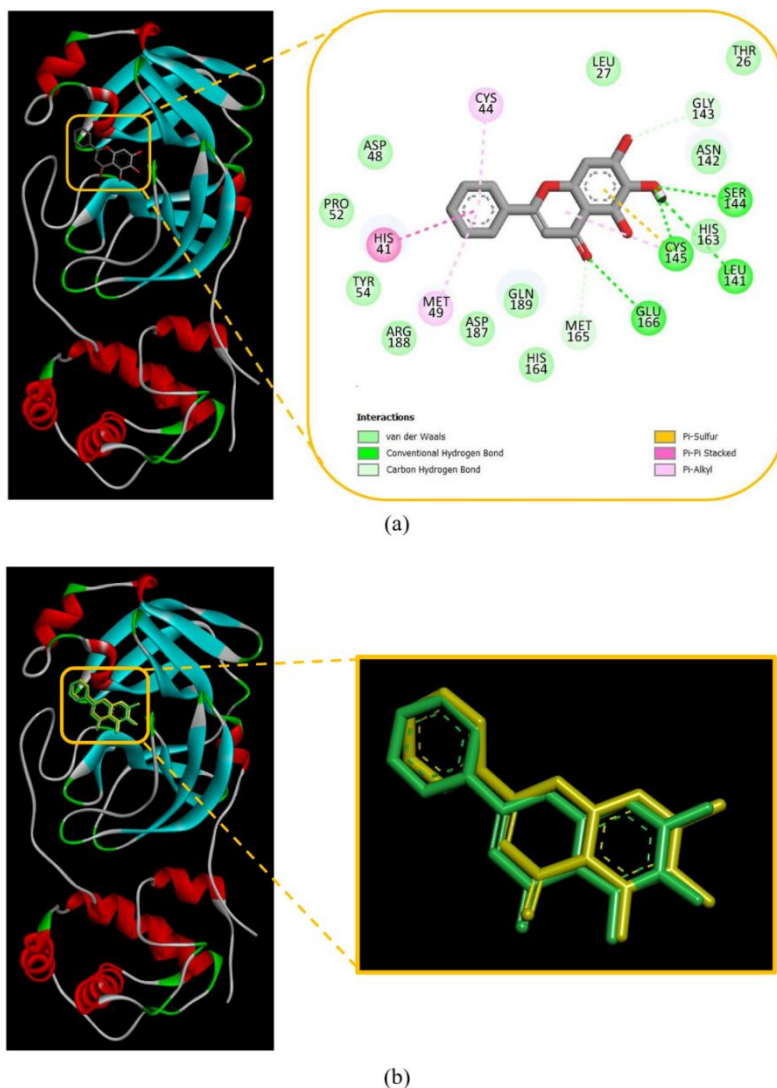
Kajian *in silico* melalui studi *molecular docking* dilakukan untuk mengeksplorasi potensi kedua senyawa hasil sintesis sebagai inhibitor 3CL<sup>pro</sup> atau M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 (PDB ID: 6M2N). Pada sisi aktif struktur kristal M<sup>Pro</sup> tersebut terikat suatu ligan bawaan (*native ligand* atau *co-crystal ligand*), yaitu senyawa baicalein yang diisolasi dari tumbuhan *S. baicalensis* (Su *et al.*, 2020). Dalam hal ini, struktur ligan bawaan tersebut memiliki kemiripan dengan struktur ligan yang ingin dikaji pada penelitian ini yaitu calkon dan flavonol yang merupakan senyawa flavonoid. Selain itu, struktur kristal 6M2N memiliki resolusi 2,2 Å. Berdasarkan literatur, resolusi tersebut sudah memenuhi persyaratan struktur protein yang akan digunakan sebagai reseptor pada kajian *molecular docking*, yaitu memiliki resolusi < 2,5 Å (Santoso, 2017).

Pada penelitian ini, baicalein juga digunakan sebagai inhibitor pembanding (kontrol positif). Hal ini dikarenakan senyawa ini telah menunjukkan aktivitas yang baik sebagai inhibitor M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 baik secara *in vitro* maupun *in silico*. Baicalein telah terbukti secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas proteolitik enzim M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 dan juga menunjukkan aktivitas antivirus yang baik pada sel Vero E6 yang terinfeksi oleh SARS-CoV-2, serta tidak bersifat sitotoksik pada sel tersebut. Berdasarkan analisis *x-ray diffraction* (XRD), (Su *et al.*, 2020) telah melaporkan bahwa mode pengikatan baicalein ke M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 jelas berbeda jika dibandingkan dengan inhibitor-inhibitor M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 lainnya. Baicalein berlingkungan di dalam inti kantong pengikatan substrat melalui interaksi dengan dua residu katalitik, *subsites* S1/S2 yang krusial dan *oxyanion loop*, yang beraksi sebagai suatu “perisai” di depan *catalytic dyad* yang secara efektif mencegah substrat mengakses *catalytic dyad* pada sisi aktif.

Pada penelitian ini, dilakukan *oriented docking*, karena *redocking* baicalein untuk keperluan validasi prosedur *docking* dilakukan dengan menargetkan sisi aktif yang telah ditandai sebagai *dummy atom* (Site 1). Dalam hal ini, *site 1* dipilih sebagai sisi aktif karena pada *site* tersebutlah baicalein sebagai ligan bawaan menempel (berikatan). Pada *site 1* tersebut terdapat asam amino His41 dan Cys145 yang merupakan *catalytic dyad*, dimana pengikatan suatu ligan pada kedua asam amino ini akan menyebabkan substrat alami menjadi terhalang untuk dapat mengakses situs katalitik sehingga aktivitas proteolitik enzim M<sup>Pro</sup> menjadi dapat dihambat (Su *et al.*, 2020). Selain itu, beberapa residu asam amino pada M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 yang potensial untuk membentuk ikatan hidrogen

dengan ligan, seperti Thr26, His41, Asn142, Gly143, Cys145, His163, Glu166 dan Gln189 (Gahlawat *et al.*, 2020) juga berada pada *site 1* tersebut.

Hasil *redocking* baicalein tersebut menunjukkan kemiripan interaksi dengan baicalein ligan bawaan. Dalam hal ini, sebanyak 17 asam amino yang terlibat dalam interaksi dengan baicalein ligan bawaan dan hasil *redocking* menunjukkan bahwa semua asam amino yang teramati berinteraksi dengan baicalein ligan bawaan tersebut juga teramati berinteraksi dengan baicalein hasil *redocking*, meskipun terdapat 3 tambahan asam amino yang berinteraksi dengan baicalein hasil *redocking*, yaitu Thr26, Asp48, dan Tyr54, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 8(a).



**Gambar 8.** Visualisasi interaksi antara baicalein dan M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 menggunakan perangkat lunak DSV 2021, (a) baicalein hasil *redocking*, (b) Overlay pose pengikatan baicalein hasil *redocking* (kuning) dan baicalein ligan bawaan (hijau).

Namun demikian, baik baicalein sebagai ligan bawaan maupun baicalein hasil *redocking* keduanya memiliki interaksi hidrofobik (ditandai oleh garis putus-putus berwarna merah muda) dengan asam amino His41 dan Cys145 yang merupakan *catalytic dyad* pada M<sup>Pro</sup>. Dalam hal ini, jenis interaksi hidrofobik yang terbentuk dengan His41 adalah interaksi *Pi-Pi stacked*, sedangkan jenis interaksi hidrofobik yang terbentuk dengan Cys145 adalah interaksi *Pi-alkil*. Kesamaan lainnya yang dapat diamati adalah baicalein ligan bawaan dan baicalein hasil *redocking* sama-sama dapat membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino Leu141, Ser144, dan Glu166. Namun demikian terdapat sedikit perbedaan dalam hal jenis interaksi dengan Gly143, di mana ligan bawaan berinteraksi melalui ikatan hidrogen konvensional (garis putus-putus hijau pekat), sedangkan baicalein hasil *redocking* berinteraksi dengan residu tersebut melalui ikatan hidrogen karbon (garis putus-putus hijau muda). Ikatan hidrogen tambahan



terbentuk antara baicalein hasil *redocking* dengan residu asam amino Cys145 yang merupakan salah satu *catalytic dyad*. Selain membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen, baicalein hasil *redocking* juga dapat membentuk interaksi Pi-sulfur dengan Cys 145. Hal ini sesuai dengan yang telah dilaporkan oleh (Su *et al.*, 2020), selain dapat membentuk interaksi hidrofobik, situs katalitik Cys145 juga membentuk interaksi S- $\pi$ , sedangkan situs katalitik His41 juga dapat membentuk interaksi  $\pi$ - $\pi$  dengan cincin aromatik baicalein. Interaksi hidrofobik lainnya juga terjadi dengan Met49 dan Cys44, dimana ini juga teramati pada interaksi ligan bawaan.

**Tabel 3.** Hasil *redocking* baicalein dan hasil *redocking* senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> ke sisi aktif M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2.

Senyawa	S (kcal/ mol)	RMSD	Jenis Interaksi <sup>a</sup>			
			Ikatan Hidrogen (Jarak Ikatan)	Interaksi van der Waals	Ikatan Hidrogen Karbon	Interaksi lainnya
Baicalein ligan bawaan	-	-	Leu141, <b>Gly143</b> <sup>b</sup> , Ser144, <b>Glu166</b> <sup>b</sup>	Leu27, Pro52, Asn142, His163, His164, Met165, Asp187, Arg188, Gln189	<b>His41</b> <sup>c</sup>	<b>His41</b> <sup>c</sup> , Cys44, Met49, <b>Cys145</b> <sup>c</sup>
Baicalein hasil <i>redocking</i>	-7,19	0,99	Leu141 (3,07 Å), Ser144 (2,66 Å), <b>Cys145</b> <sup>c</sup> (2,56 Å), <b>Glu166</b> <sup>b</sup> (2,58 Å)	Thr26, Leu27, Asp48, Pro52, Tyr54, Asn142, His163, His164, Asp187, Arg188, Gln189	<b>Gly143</b> , Met165	<b>His41</b> <sup>c</sup> , Cys44, Met49, <b>Cys145</b> <sup>c</sup>
Senyawa C <sub>345</sub>	-8,95	1,23	<b>Glu166</b> <sup>b</sup> (3,92 Å)	Thr25, Val42, Cys44, Asp48, Pro52, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, <b>Gly143</b> <sup>b</sup> , Ser144, His163, His164, Met165, Val186, Gln192	Met49, <b>His41</b> <sup>c</sup> , Asp187, Arg188, Gln189	<b>His41</b> <sup>c</sup> , Met49, <b>Cys145</b> <sup>c</sup>
Senyawa F <sub>345</sub>	-9,02	1,37	<b>Gly143</b> <sup>b</sup> (2,38 Å), <b>Gly143</b> <sup>b</sup> (2,40 Å), His164 (1,88 Å)	Thr26, Asp48, Pro52, Tyr54, Phe140, Ser144, Met165, Arg188, Gln189	Leu141, Asn142, <b>Glu166</b> <sup>b</sup> , Asp187	Leu27, <b>His41</b> <sup>c</sup> , Cys44, Met49, <b>Cys145</b> <sup>c</sup> , His163

<sup>a</sup> visualisasi jenis interaksi ligan-protein dilakukan menggunakan perangkat lunak DSV 2021,

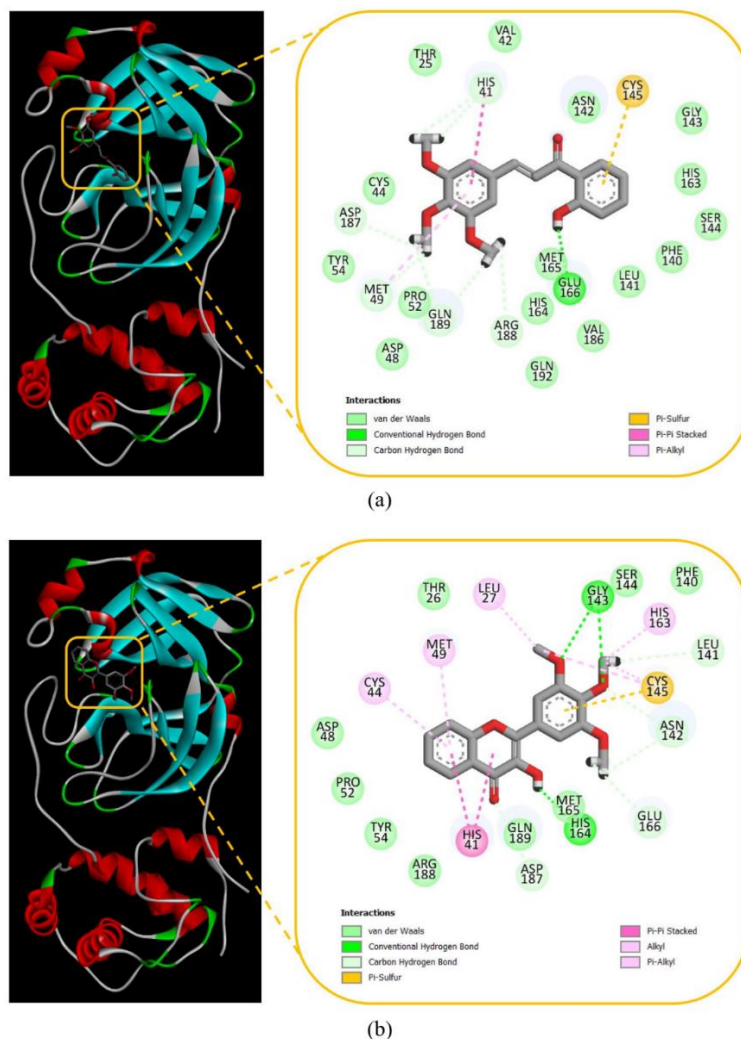
<sup>b</sup> residu asam amino penting pada M<sup>Pro</sup> yang terlibat dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan ligan,

<sup>c</sup> *catalytic dyad* pada sisi aktif M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2.

*Overlay* pose pengikatan baicalein hasil *redocking* dengan baicalein ligan bawaan kemudian dilakukan untuk memastikan kesamaan orientasi pengikatan dari keduanya, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 8(b). Hasil *overlay* juga menunjukkan bahwa pose pengikatan keduanya sangat mirip, karena struktur ligan bawaan dan ligan hasil *redocking* teramati berhimpit mendekati sempurna. Berdasarkan hasil *redocking* juga diperoleh nilai energi bebas pengikatan baicalein sebesar -7,19 kcal/mol dengan nilai RMSD sebesar 0,99, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 3. Nilai RMSD pada hasil *docking* adalah nilai yang menunjukkan penyimpangan kesalahan yang terjadi saat melakukan *docking*, semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa penyimpangan kesalahan dalam melakukan *docking* kecil. Jika nilai RMSD pada hasil *docking*  $\leq 2$  Å, maka prosedur *redocking* yang dilakukan dapat dikatakan telah valid (Ikhtiarudin *et al.*, 2021; Ikhtiarudin *et al.*, 2022<sup>b</sup>). Berdasarkan nilai RMSD tersebut dapat disimpulkan bahwa prosedur *redocking* yang dipilih telah valid.



Prosedur yang sama kemudian diaplikasikan untuk *docking* ligan-ligan lainnya, yaitu senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> hasil sintesis. Berdasarkan hasil *docking* sebagaimana dipresentasikan pada Tabel 3 dapat diamati bahwa kedua senyawa tersebut juga dapat berinteraksi dengan *catalytic dyad* His41 dan Cys145 sebagaimana halnya baicalein sebagai inhibitor pembanding. Berdasarkan Gambar 9(a), dapat diamati bahwa situs katalitik His41 berinteraksi dengan cincin B senyawa C<sub>345</sub> melalui interaksi hirofobik Pi-Pi *stacked* yang diperkuat oleh ikatan hidrogen karbon dengan kehadiran gugus metoksi pada cincin B senyawa C<sub>345</sub>, sedangkan cincin A berinteraksi dengan situs katalitik lainnya (Cys145) melalui ikatan Pi-Sulfur. Selanjutnya, berdasarkan Gambar 9(b), dapat diamati bahwa cincin A dan C senyawa F<sub>345</sub> teramati dapat berinteraksi dengan situs katalitik His41 melalui interaksi hidrofobik pi-pi *stacked*, sedangkan cincin B-nya teramati berinteraksi dengan situs katalitik Cys145 melalui ikatan Pi-Sulfur yang diperkuat oleh interaksi hidrofobik alkil dan Pi-alkil dengan kehadiran gugus metoksi pada cincin B senyawa F<sub>345</sub> tersebut.



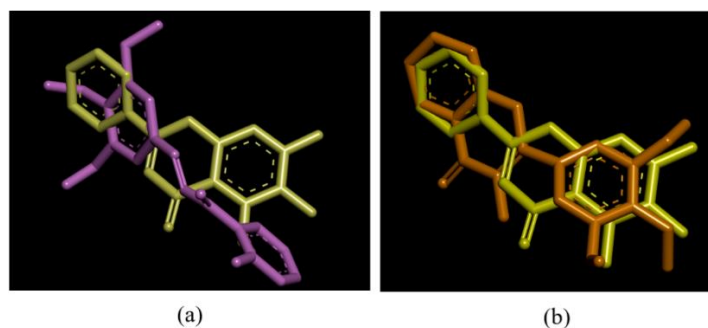
**Gambar 9.** Visualisasi interaksi antara senyawa-senyawa hasil sintesis dan M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 menggunakan perangkat lunak DSV 2021, (a) senyawa C<sub>345</sub>, (b) senyawa F<sub>345</sub>.

Berdasarkan hasil *docking* juga dapat diamati bahwa senyawa C<sub>345</sub> dapat membentuk satu ikatan hidrogen dengan asam amino dengan Glu166 (pada jarak 3,92 Å ke atom H dari gugus 2'-OH), sedangkan senyawa F<sub>345</sub> dapat membentuk dua ikatan hidrogen dengan Gly143 (pada jarak 2,38 Å ke atom C dari gugus OCH<sub>3</sub> dan pada jarak 2,40 Å ke atom O dari gugus OCH<sub>3</sub>), serta satu ikatan hidrogen dengan His164 (pada jarak 1,88 Å ke atom O dari gugus C=O), sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan literatur, Glu166 adalah salah satu residu asam amino penting yang berperan dalam penghambatan aktivitas M<sup>Pro</sup>, terbentuknya ikatan hidrogen antara suatu ligan dengan residu ini berperan dalam kuatnya aktivitas penghambatan ligan terhadap aktivitas enzim M<sup>Pro</sup> (Razzaghi-Asl *et al.*, 2021). Selain Glu 166, literatur lainnya juga melaporkan bahwa interaksi ikatan hidrogen dengan residu Gly143 dan Gln189 juga sangat penting untuk pengikatan ligan (Venugopal and Chakraborty,

2021). Selain dapat berinteraksi dengan kedua asam amino pada kedua situs katalitik dan juga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan beberapa residu asam amino penting pada sisi aktif M<sup>Pro</sup>, interaksi kedua senyawa hasil sintesis dengan sisi aktif M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 juga diperkuat oleh beberapa jenis interaksi lain seperti interaksi van der Waals, ikatan hidrogen karbon, dan beberapa interaksi hidrofobik, sebagaimana dapat dilihat pada [Gambar 9\(a\)](#) dan [Gambar 9\(b\)](#).

Berdasarkan [Tabel 3](#), dapat dilihat bahwa senyawa C<sub>345</sub> memiliki nilai energi bebas pengikatan sebesar -8,95 kcal/mol, sedangkan senyawa F<sub>345</sub> memiliki nilai energi bebas pengikatan sebesar -9,02 kcal/mol. Dalam hal ini, nilai energi bebas pengikatan kedua senyawa hasil sintesis teramati lebih negatif dari nilai energi bebas pengikatan baicalein sebagai inhibitor pembanding (-7,19 kcal/mol). Hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa hasil sintesis memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan baicalein dalam membentuk kompleks dengan M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2. Selain itu, sebanyak 18 asam amino yang berinteraksi dengan senyawa C<sub>345</sub> juga teramati berinteraksi dengan baicalein hasil *redocking* (kontrol positif) dan sebanyak 20 asam amino yang berinteraksi dengan senyawa F<sub>345</sub> juga teramati dapat berinteraksi dengan kontrol positif, sebagaimana dapat dilihat pada [Tabel SI 5](#) (Lihat [Supporting Information](#)). Selain jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak, hal ini yang mungkin membuat senyawa energi bebas ikatan senyawa F<sub>345</sub> lebih negatif dari senyawa C<sub>345</sub>. Dengan kata lain, senyawa senyawa F<sub>345</sub> berpotensi memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa C<sub>345</sub> sebagai inhibitor M<sup>Pro</sup>-SARS-CoV-2.

*Overlay* pose pengikatan kemudian dilakukan untuk mengamati apakah masing-masing senyawa hasil sintesis memiliki orientasi pengikatan yang sama atau berbeda dengan baicalein hasil *redocking* sebagai inhibitor pembanding (kontrol positif), sebagaimana dapat dilihat pada [Gambar 10\(a\)](#) dan [Gambar 10\(b\)](#). Hasil *overlay* menunjukkan bahwa di antara kedua senyawa hasil sintesis, senyawa F<sub>345</sub> memiliki orientasi pose pengikatan yang lebih mirip dengan pose pengikatan baicalein dibandingkan senyawa C<sub>345</sub>. Dalam hal ini, gugus karbonil baik pada senyawa F<sub>345</sub> maupun baicalein sama-sama mengarah ke residu asam amino Glu166 yang berperan penting dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2, sedangkan gugus fenil (cincin aromatik) pada senyawa F<sub>345</sub> dan baicalein teramati memiliki orientasi yang sedikit berbeda. Namun demikian, berdasarkan keseluruhan hasil kajian *docking* dapat diprediksi bahwa senyawa F<sub>345</sub> memiliki potensi aktivitas yang paling baik sebagai inhibitor M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 dibandingkan dengan baicalein maupun senyawa C<sub>345</sub>.



**Gambar 10.** Visualisasi *overlay* pose pengikatan ligan menggunakan perangkat lunak DSV 2021, (a) senyawa C<sub>345</sub> (ungu) dengan baicalein (kuning), (b) senyawa F<sub>345</sub> (jingga) dengan baicalein (kuning).

Molekul yang berpotensi aktif harus mampu mencapai targetnya di dalam tubuh dalam konsentrasi yang cukup. Selain itu, molekul tersebut juga harus tersedia di dalam tubuh dalam bentuk bioaktif yang cukup lama untuk terjadinya aktivitas biologis yang diharapkan. Oleh karena itu, dalam tahapan pengembangan obat juga diperlukan penilaian terhadap profil absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME) dari senyawa aktif yang sedang dikaji, karena pada banyak kasus ketika konsentrasi suatu senyawa kandidat obat dianggap banyak, tetapi akses ke reseptor target ternyata terbatas, dikarenakan senyawa kandidat tersebut tidak memiliki profil ADME yang baik. Untuk tujuan tersebut, beberapa pendekatan komputasi telah dikembangkan sebagai alternatif yang valid untuk menentukan profil ADME dari suatu senyawa aktif yang sedang dikembangkan ([Daina et al., 2017](#)).

Pada penelitian ini, kami juga melaporkan hasil kajian *in silico* sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, dan sifat kemiripan dengan obat (*druglikeness*) dari masing-masing senyawa hasil sintesis dan dibandingkan dengan baicalein sebagai inhibitor pembanding. Prediksi sifat fisiko-kimia dilakukan untuk menentukan rumus kimia, kalkulasi berat molekul, jumlah *heavy atoms* (atom selain hidrogen) dan *heavy atoms* aromatik (atom selain

hidrogen yang berada pada cincin aromatik), Fraksi atom C dengan hibridisasi  $sp^3$ , jumlah ikatan yang dapat berotasi, jumlah akseptor dan donor ikatan hidrogen, refraktivitas molar, dan total luas permukaan polar (*total polar surface area*, TPSA). Kemudian prediksi sifat lipofilisitas dilakukan untuk menentukan nilai  $\text{Log } P_{o/w}$ . Selanjutnya, prediksi profil farmakokinetik dilakukan untuk menentukan nilai absorpsi gastrointestinal (GI), distribusi *blood-brain barrier* (BBB), substrat *P-glycoprotein* (P-gp), inhibitor *cytochrome* P450. Selain itu, prediksi sifat kemiripan dengan obat juga dilakukan untuk menentukan apakah senyawa hasil sintesis memiliki sifat kemiripan dengan obat berdasarkan aturan Lipinski, Ghose, Veber, Egan, dan Muegge, dibandingkan dengan baicalein. Hasil kajian *in silico* sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, dan sifat kemiripan dengan obat dari kedua senyawa hasil sintesis dan baicalein sebagai pembandingan dapat dilihat pada [Tabel 4](#).

**Tabel 4.** Hasil kajian *in silico* sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetik, dan sifat kemiripan dengan obat (*druglikeness*).

Sifat-Sifat	Senyawa		
	C <sub>345</sub>	F <sub>345</sub>	Baicalein
1. Fisiko-kimia			
a. Rumus kimia	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
b. Berat molekul	314,33 g/mol	328,32 g/mol	270,24 g/mol
c. Jumlah <i>heavy atoms</i>	23	24	20
d. Jumlah <i>aromatic heavy atoms</i>	12	16	16
e. Fraksi C $sp^3$	0,17	0,17	0,00
f. Jumlah ikatan yang dapat berotasi	6	4	1
g. Jumlah akseptor ikatan hidrogen	5	6	5
h. Jumlah donor ikatan hidrogen	1	1	3
i. Refraktivitas molar	87,75	89,42	73,99
j. Total luas permukaan polar (TPSA)	64,99 Å <sup>2</sup>	78,13 Å <sup>2</sup>	90,90 Å <sup>2</sup>
2. Lipofilisitas			
a. $\text{Log } P_{o/w}$ (MLOGP)	1,75	0,70	0,52
b. $\text{Log } P_{o/w}$ (WLOGP)	3,21	3,19	2,58
c. $\text{Log } P_{o/w}$ (XLOGP)	3,80	3,31	3,16
3. Farmakokinetik			
a. absorpsi GI	Tinggi	Tinggi	Tinggi
b. distribusi BBB	Ya	Ya	Tidak
c. substrat P-gp	Tidak	Tidak	Tidak
d. inhibitor CYP1A2	Ya	Ya	Ya
e. inhibitor CYP2C19	Ya	Tidak	Tidak
f. inhibitor CYP2C9	Ya	Ya	Tidak
g. inhibitor CYP2D6	Tidak	Ya	Ya
h. inhibitor CYP3A4	Ya	Ya	Ya
4. Kemiripan dengan obat			
a. Lipinski	Ya	Ya	Ya
b. Ghose	Ya	Ya	Ya
c. Veber	Ya	Ya	Ya
d. Egan	Ya	Ya	Ya
e. Muegge	Ya	Ya	Ya
f. Skor Bioavailabilitas	0,55	0,55	0,55

Berdasarkan [Tabel 4](#), dapat diamati bahwa kedua senyawa hasil sintesis diprediksi memiliki beberapa kesamaan sifat fisiko-kimia dengan baicalein sebagai inhibitor pembandingan. Dalam hal ini, dapat diamati bahwa senyawa F<sub>345</sub> memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa C<sub>345</sub>, karena terjadi penambahan satu atom oksigen yang berasal dari hidrogen peroksida pada strukturnya. Namun demikian, berat molekul dari kedua senyawa hasil sintesis masih sesuai dengan aturan Lipinski ( $\leq 500$ ), Ghose (160 – 480), dan Muegge (200-600) ([Daina et al., 2017](#); [Ghose et al., 1999](#); [Lipinski et al., 2021](#); [Muegge et al., 2001](#)). Selain itu, penambahan satu atom oksigen pada senyawa F<sub>345</sub> juga menyebabkan bertambahnya jumlah *heavy atoms*, jumlah

akseptor ikatan hidrogen, dan nilai TPSA senyawa F<sub>345</sub>. Di sisi lain, penambahan satu atom oksigen tersebut menyebabkan penurunan nilai log P senyawa F<sub>345</sub>, sehingga sifat lipofilisitas senyawa F<sub>345</sub> menjadi berkurang jika dibandingkan dengan senyawa C<sub>345</sub>. Semakin rendah nilai log P, maka suatu senyawa akan semakin bersifat hidrofilik dan kelarutannya dalam air akan semakin besar (Nurlelarsi *et al.*, 2023) dan hal yang sebaliknya juga berlaku. Jika dibandingkan dengan nilai log P baicalein, kedua senyawa hasil sintesis lebih bersifat lipofilik. Dalam hal ini, baicalein lebih bersifat hidrofilik karena pada struktur baicalein terdapat tiga buah gugus hidroksi, sedangkan pada kedua senyawa hasil sintesis hanya terdapat satu gugus hidroksi. Namun demikian, jumlah atom selain atom hidrogen pada struktur kedua senyawa hasil sintesis masih sesuai dengan aturan Ghose (20 – 70), serta jumlah akseptor ikatan hidrogen dan jumlah donor ikatan hidrogen pada struktur kedua senyawa hasil sintesis juga masih sesuai dengan aturan Lipinski dan Muegge (akseptor  $\leq 10$  dan donor  $\leq 5$ ). Selanjutnya, nilai TPSA dari kedua senyawa hasil sintesis juga masih sesuai dengan aturan Veber ( $\leq 140$ ), Egan ( $\leq 131,6$ ), dan Muegge ( $\leq 150$ ). Selain itu, sifat lipofilisitas dari kedua senyawa hasil sintesis juga masih mengikuti aturan Lipinski (MPLOGP  $\leq 4,15$ ), Ghose (WLOGP -0,4 sampai 5,6), Egan (WLOGP  $\leq 5,88$ ), dan Muegge (XLOGP -2 sampai 5) (Daina *et al.*, 2017; Egan *et al.*, 2000; Ghose *et al.*, 1999; Lipinski *et al.*, 2021; Muegge *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002).

Berdasarkan Tabel 4 juga dapat diamati bahwa siklisasi atau pembentukan cincin C juga menyebabkan berkurangnya jumlah ikatan yang dapat berotasi pada senyawa F<sub>345</sub>. Senyawa C<sub>345</sub> memiliki 6 *rotatable bonds*, sedangkan senyawa F<sub>345</sub> memiliki 4 *rotatable bonds*. Namun demikian, jumlah ikatan yang dapat berotasi pada kedua senyawa hasil sintesis masih mengikuti aturan Veber ( $\leq 10$ ) dan Muegge ( $\leq 15$ ) (Daina *et al.*, 2017; Muegge *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002). Sebuah penelitian telah melaporkan bahwa pengurangan jumlah *rotatable bonds* dan TPSA dari suatu molekul dapat memberikan efek positif pada bioavailabilitasnya (Mahgoub *et al.*, 2022). Selain itu, nilai refraktivitas molar dari kedua senyawa hasil sintesis juga sesuai dengan aturan Ghose (40 – 130) (Daina *et al.*, 2017; Ghose *et al.*, 1999). Dengan demikian, secara keseluruhan, kedua senyawa hasil sintesis dan baicalein sama-sama memiliki sifat fisiko-kimia dan profil farmakokinetik yang baik, serta memiliki sifat kemiripan dengan senyawa obat.

Kedua senyawa hasil sintesis diprediksi memiliki sifat absorpsi GI yang tinggi dan juga tidak berperan sebagai substrat P-glycoprotein (P-gp). Berdasarkan literatur, P-gp merupakan salah satu *transporter ATP binding cassette* (ABC) yang berada di sepanjang saluran pencernaan, khususnya di dalam epitel usus. Transporter ini berfungsi untuk memompa efluks dari transmembran, sehingga P-gp menjadi salah satu masalah serius dalam penemuan obat karena dapat membatasi penyerapan bahan aktif obat yang berujung pada rendahnya bioavailabilitas dari suatu bahan aktif obat. Bioavailabilitas merupakan ketersediaan hayati atau jumlah obat yang masuk ke dalam sirkulasi sistemik. Hal ini berhubungan dengan efek terapi yang akan dihasilkan oleh obat tersebut, dimana obat-obat yang memiliki bioavailabilitas lebih rendah akan menghasilkan efek terapi yang lebih sedikit (Latif *et al.*, 2017). Hasil kajian *in situ* terhadap baicalein menunjukkan bahwa baicalein dapat diserap dengan baik di lambung dan usus kecil (usus halus), namun penyerapannya agak terbatas di usus besar (Liang *et al.*, 2017; Taiming & Xuehua, 2006). Dengan demikian, berdasarkan kajian *in silico* pada Tabel 4, dapat dilihat bahwa kedua senyawa hasil sintesis dan baicalein memiliki skor bioavailabilitas yang sama, yaitu 0,55. Hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa hasil sintesis memiliki profil farmakokinetik yang baik (Bojarska *et al.*, 2020). Kedua senyawa hasil sintesis dan juga baicalein termasuk jenis flavonoid aglikon. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa aglikon flavonoid umumnya memiliki bioavailabilitas yang lebih tinggi dibandingkan bentuk glikosidanya (Zhang *et al.*, 2020).

Berdasarkan Tabel 4, kedua senyawa hasil sintesis juga diprediksi memiliki kemampuan distribusi melewati sawar darah otak atau *blood brain barrier* (BBB). Otak manusia dilindungi oleh BBB yang dapat mencegah masuknya zat atau senyawa asing maupun patogen ke jaringan otak. Sehingga kemampuan bahan aktif obat untuk dapat masuk ke otak merupakan parameter penting yang harus dipertimbangkan, dalam hal ini untuk meningkatkan efikasi obat yang aktivitas farmakologinya ada di dalam otak (Abdullah *et al.*, 2021). Zat tertentu dengan molekul yang larut dalam lemak dan berat molekul rendah di bawah 400 – 600 Da memiliki kemungkinan untuk dapat diangkut melintasi BBB (Pardridge *et al.*, 1995). Suatu penelitian juga telah melaporkan bahwa baicalein dapat melintasi BBB, dan telah ditemukan di otak tikus setelah pemberian ekstrak *S. baicalensis* secara oral (Fong *et al.*, 2014). Berdasarkan literatur, terdapat bukti-bukti kuat yang mengarahkan kepada kesimpulan bahwa virus SARS-CoV-2 dapat menembus BBB (Zhang *et al.*, 2021). Oleh karena itu, dalam mendesain antivirus SARS-CoV-2 juga perlu mempertimbangkan kemampuan senyawa aktif tersebut dalam menembus BBB, sehingga diharapkan antivirus yang dikembangkan nantinya juga dapat menghambat replikasi SARS-CoV-2 yang berhasil masuk ke jaringan otak. Namun demikian, perlu diperhatikan juga bahwa infeksi SARS-CoV-2 juga dapat menyebabkan



disfungsi neuroinvasif dan sawar darah-otak (Chen *et al.*, 2022). Sebuah review telah melaporkan bahwa SARS-CoV-2 dapat menginfeksi sel neurovaskular dan meningkatkan permeabilitas BBB. Peningkatan permeabilitas BBB ini akan memungkinkan lewatnya obat-obatan yang tidak mencapai otak dalam keadaan fisiologis normal, sehingga meningkatkan efek menguntungkan atau merugikan obat tertentu (Hernández-Parra *et al.*, 2023).

Profil penting lainnya adalah metabolisme. Umumnya obat diubah dan atau dimetabolisme di hati dan proses ini dibantu oleh beberapa isozim yang bertanggung jawab atas biotransformasi dan metabolisme banyak obat. Metabolisme melalui sistem sitokrom P450 merupakan penentu penting dalam terjadinya banyak interaksi obat yang dapat mengakibatkan toksisitas obat, menurunnya efek farmakologis, dan juga reaksi obat yang merugikan. Oleh karena itu, penting untuk mengenali apakah obat tersebut memang benar terlibat sebagai substrat, penginduksi, atau penghambat sitokrom P450 (Ogu *and* Maxa, 2000). Pada penelitian ini, prediksi profil metabolisme senyawa hasil sintesis dilakukan terhadap lima isozim dari sitokrom P450, yaitu CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4. Berdasarkan Tabel 4, kedua senyawa hasil sintesis menunjukkan potensi penghambatan terhadap empat dari lima isozim, sedangkan baicalein sebagai inhibitor pembanding menunjukkan potensi penghambatan terhadap tiga dari lima isozim tersebut. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa rute utama metabolisme baicalein dalam plasma dan urin adalah metabolisme terkonjugasi. Setelah pemberian baicalein secara intravena, sekitar 76% baicalein diubah menjadi bentuk terkonjugasi (Lai *et al.*, 2003). Hal ini dikarenakan molekul obat yang sudah mempunyai gugus -OH, -NH<sub>2</sub> atau COOH dapat melewati metabolisme Fase I dan langsung masuk ke metabolisme Fase II untuk mengalami konjugasi. Metabolisme fase I terdiri dari reaksi reduksi, oksidasi, atau hidrolisis. Reaksi ini berfungsi untuk mengubah molekul obat yang bersifat lipofilik menjadi molekul yang lebih polar dengan menambahkan gugus fungsi polar seperti -NH<sub>2</sub> atau -OH. Reaksi-reaksi ini juga sering kali menghasilkan metabolit aktif dan bermanfaat dalam mengaktifkan *prodrug* ke dalam keadaan aktif dan terapeutiknya. Fase I mencakup penggunaan sistem sitokrom P450 yang ditemukan pada membran retikulum endoplasma. Jika sistem CYP450 dihambat dengan cara apa pun maka kadar obat akan meningkat, dan sebaliknya jika diinduksi, kadar obat akan menurun (Phang-Lyn and Llerena, 2023). Dalam hal ini, senyawa C<sub>345</sub> yang memiliki nilai log P paling besar (paling lipofilik) mungkin cenderung mengalami metabolisme fase I terlebih dahulu, baru kemudian mengalami metabolisme fase II. Reaksi fase II ini terdiri dari penambahan gugus hidrofilik ke molekul asli, suatu intermediet toksik atau metabolit tidak toksik yang terbentuk pada fase I, yang memerlukan transformasi lebih lanjut untuk meningkatkan polaritasnya. Reaksi-reaksi tersebut meliputi reaksi konjugasi, glukuronidasi, asetilasi, dan sulfasi. Tujuan akhir dari reaksi fase II adalah membentuk produk yang larut dalam air yang dapat dikeluarkan oleh tubuh (Phang-lyn and Llerena, 2023). Dalam hal ini, baicalein yang memiliki nilai log P paling kecil (paling hidrofilik) mungkin dapat melewati metabolisme Fase I dan langsung masuk ke metabolisme Fase II untuk mengalami konjugasi.

Kemajuan dalam bidang kimia komputasi juga telah memungkinkan dilakukannya metode *in silico* untuk penilaian risiko toksisitas atau profil keamanan suatu bahan kimia oleh industri farmasi. Dalam hal ini, prediksi risiko toksisitas dapat dilakukan untuk memprediksi risiko hepatotoksitas, karsinogenisitas, imunotoksitas, mutagenisitas, sitotoksitas, *lethal dose* 50 (LD<sub>50</sub>), dan kelas toksisitas dari kedua senyawa hasil sintesis (Banerjee *et al.*, 2018). Hasil kajian *in silico* risiko toksisitas senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> dibandingkan dengan baicalein sebagai inhibitor pembanding dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 5, dapat diamati bahwa kedua senyawa hasil sintesis dan baicalein sama-sama tidak memiliki risiko hepatotoksik, dan sitotoksitas. Kedua senyawa hasil sintesis hanya memiliki satu risiko toksisitas, yaitu imunotoksik, sedangkan baicalein sebagai inhibitor pembanding memiliki dua risiko toksisitas, yaitu karsinogenik dan mutagenik. Dalam hal ini, probabilitas risiko imunotoksitas dari kedua senyawa hasil sintesis diprediksi lebih tinggi (99 % dan 95%) dibandingkan dengan probabilitas risiko karsinogenisitas dan mutagenisitas baicalein (68% dan 51%). Hal ini tentunya perlu dijadikan sebagai catatan dalam pengembangan kedua senyawa ini kedepannya, dimana modifikasi struktur mungkin dapat diterapkan untuk menurunkan risiko toksisitas dari kedua senyawa hasil sintesis tersebut. Selanjutnya, berdasarkan kelas toksisitasnya, ketiga senyawa, baik senyawa C<sub>345</sub>, F<sub>345</sub>, maupun baicalein sama-sama termasuk kelas toksisitas 5 yang bermakna mungkin berbahaya jika terhirup. Senyawa F<sub>345</sub> yang memiliki nilai energi bebas pengikatan paling negatif diprediksi menunjukkan nilai LD<sub>50</sub> paling tinggi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa senyawa F<sub>345</sub> selain memiliki potensi yang lebih baik sebagai inhibitor, juga diprediksi lebih aman dari risiko toksisitas dibandingkan dengan baicalein sebagai salah satu inhibitor M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 yang telah terbukti memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas proteolitik M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 baik secara *in silico* maupun *in vitro*.



**Tabel 5.** Hasil kajian *in silico* risiko toksisitas senyawa C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub> dibandingkan dengan baicalein menggunakan website protox-II.

Risiko Toksisitas	C <sub>345</sub>		F <sub>345</sub>		Baicalein	
	Prediksi	Probabilitas (%)	Prediksi	Probabilitas (%)	Prediksi	Probabilitas (%)
Hepatotoksitas	Tidak aktif	53	Tidak aktif	69	Tidak aktif	69
Karsinogenisitas	Tidak aktif	66	Tidak aktif	57	Aktif	68
Immunotoksitas	Aktif	99	Aktif	95	Tidak aktif	99
Mutagenisitas	Tidak aktif	77	Tidak aktif	70	Aktif	51
Sitotoksitas	Tidak aktif	99	Tidak aktif	99	Tidak aktif	99
LD <sub>50</sub>	2100 mg/kg		5000 mg/kg		3919 mg/kg	
Kelas Toksisitas	5		5		5	

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode iradiasi *microwave* terbukti dapat mempercepat waktu reaksi dan meningkatkan rendemen produk murni pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon dan flavonol tersubstitusi trimetoksi (C<sub>345</sub> dan F<sub>345</sub>). Hasil kajian *in silico* melalui *molecular docking* menunjukkan bahwa kedua senyawa dapat membentuk ikatan hidrogen dengan beberapa residu penting pada sisi aktif dan dapat terikat pada kedua situs katalik (*catalytic dyad*) M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2, yaitu His41 dan Cys145 melalui interaksi hidrofobik dengan nilai energi bebas pengikatan yang lebih negatif dibandingkan dengan baicalein sebagai inhibitor pembanding. Hasil kajian *in silico* lainnya juga menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki profil farmakokinetik yang baik dan memiliki sifat kemiripan dengan obat. Selain itu, senyawa F<sub>345</sub> diprediksi memiliki risiko toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan baicalein yang telah terbukti memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas proteolitik M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 secara *in silico* dan *in vitro*.

## INFORMASI PENDUKUNG

Tabel SI 1–5 dan Gambar SI 1–18 tersedia sebagai informasi pendukung (*supporting information*) pada artikel ini dan dapat diakses melalui <https://jurnal.uns.ac.id/alchemy/editor/downloadFile/78445/245450>.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam penulisan artikel ini.

## KONTRIBUSI PENULIS

II dan NF : perancang penelitian, interpretasi data, dan penulis artikel; RA dan II: sintesis, uji kemurnian dengan HPLC, dan pengukuran spektrum UV-Vis, FT-IR, dan HRMS; AWS: pengukuran spektrum <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C NMR; RA, II, dan NF: kajian *in silico* terhadap struktur senyawa hasil sintesis; MRN dan EM: koreksi dan saran dalam penulisan artikel untuk *submission*; II dan NF: revisi artikel berdasarkan saran *reviewer*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau (STIFAR Riau) yang telah membiayai penelitian ini melalui hibah penelitian terapan pendanaan tahun 2023 dengan kontrak penelitian No. 13g.05.15.P3M.STIFAR.VIII.2023. Penelitian ini juga didukung oleh fasilitas riset, dan dukungan ilmiah serta teknis dari Laboratorium Karakterisasi Lanjut Serpong di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, S. S., Putra, P. P., Antasionasti, I., Rundengan, G., Suoth E. J., Abdullah, R. P. I., and Abdullah, F., 2021. Analisis Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik, dan Toksikologi pada Pericarpium Pala (*Myristica fragrans*) secara Artificial Intelligence. *Chemistry Progress*, 14(2), 81–92. <https://doi.org/10.35799/cp.14.2.2021.37112>.
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., and Preissner, R., 2018. ProTox-II: a Webserver for the Prediction of Toxicity of Chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>.
- Bennett, M., Burke, A. J., and O'Sullivan, W. I., 1996. Aspect of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction.

- Tetrahedron*, 52(20), 7163–7178. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00334-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00334-1).
- Birnie, E., Biemond, J. J., Appelman, B., de Bree, G. J., Jonges, M., Welkers, M. R. A., and Wiersinga, W. J., 2022. Development of Resistance-Associated Mutations After Sotrovimab Administration in High-Risk Individuals Infected With the SARS-CoV-2 Omicron Variant. *JAMA*, 328(11), 1104–1107. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.13854>.
- Bojarska, J., Remko, M., Breza, M., Madura, I. D., Kaczmarek, K., Zabrocki, J., and Wolf, W. M., 2020. A Supramolecular Approach to Structure-Based Design with A Focus on Synthons Hierarchy in Ornithine-Derived Ligands: Review, Synthesis, Experimental and in Silico Studies. *Molecules*, 25(5), 1135. <https://doi.org/10.3390/molecules25051135>.
- Chaves, O. A., Fintelman-Rodrigues, N., Wang, X., Sacramento, C. Q., Temerozo, J. R., Ferreira, A. C., Mattos, M., Pereira-Dutra, F., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., Russo, J. J., Ju, J., and Souza, T. M. L., 2022. Commercially Available Flavonols Are Better SARS-CoV-2 Inhibitors than Isoflavone and Flavones. *ACS Omega*, 7, 44542–44555. <https://doi.org/10.3390/v14071458>.
- Chemical Books, 2023. (E)-2'-Hydroxychalcone (IRI). <[https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_888-12-0\\_IRI.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_888-12-0_IRI.htm)> (diakses pada 13 Agustus 2023).
- Chen, Y., Yang, W., Chen, F., and Cui, L., 2022. COVID-19 and Cognitive Impairment: Neuroinvasive and Blood–Brain Barrier Dysfunction. *Journal of Neuroinflammation*, 19, 222. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02579-8>.
- Cucinotta, D., and Vanelli, M., 2020. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*, 91(1), 157–160. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>.
- 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, 42717. <http://doi.org/10.1038/srep42717>.
- Dias, T. A., Duarte, C. L., Lima, C. F., Proença, M. F., and Pereira-Wilson, C., 2013. Superior Anticancer Activity of Halogenated Chalcones and Flavonols Over the Natural Flavonol Quercetin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.064>.
- Egan, W. J., Merz, K. M., and Baldwin, J. J., 2000. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21), 3867–3877. <https://doi.org/doi:10.1021/jm000292e>.
- [FDA] Food and Drug Administration, 2023. *Coronavirus (COVID-19) drugs*. <<https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>> (diakses pada 19 Juli 2023).
- Fong, S. Y., Wong, Y. C., Zuo, Z., 2014. Development of a SPE-LC/MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Baicalein, Wogonin, Oroxylin A and Their Glucuronides Baicalin, Wogonoside and Oroxyloside in Rats and its Application to Brain Uptake and Plasma Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 97, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.033>.
- Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Dona, R., Putri, I., and Septama, A., 2023. Synthesis of 3'-Methoxy Flavonol and Its Derivatives as Potential Inhibitors for Dengue NS2B/NS3 and Molecular Insight into Binding Interaction. *Pharmacy Education*, 23(2), 231–243. <https://doi.org/10.46542/pe.2023.232.231243>.
- Gahlawat, A., Kumar, N., Kumar, R., Sandhu, H., Singh, I. P., Singh, S., Sjöstedt, A., and Garg, P., 2020. Structure-Based Virtual Screening to Discover Potential Lead Molecules for the SARS-CoV-2 Main Protease. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(12), 5781–5793. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00546>.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J., 1999. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1, 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- Gyebi, G. A., Ogunro, O. B., Adegunloye, A. P., Ogunyemi, O. M., and Afolabi, S. O., 2021. Potential Inhibitors of Coronavirus 3-Chymotrypsin-Like Protease (3CLpro): An In Silico Screening of Alkaloids and Terpenoids from African Medicinal Plants. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3396–3408. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1764868>.
- Hernández-Parra, H., Reyes-Hernández, O. D., Figueroa-González, G., González-Del, C. M., González-Torres, M., Peña-Corona, S. I., Florán, B., Cortés, H., and Leyva-Gómez, G., 2023. Alteration of the Blood-Brain Barrier by COVID-19 and Its Implication in the Permeation of Drugs into the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1125109. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1125109>.
- Iketani, S., Mohri, H., Culbertson, B., Hong, S. J., Duan, Y., Luck, M. I., Annavajhala, M. K., Guo, Y., Sheng, Z., Uhlemann, A., Goff, S. P., Sabo, Y., Yang, H., Chavez, A., and Ho, D. D., 2023. Multiple Pathways for SARS-CoV-2 Resistance to Nirmatrelvir. *Nature*, 613, 558–564. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05514->

2.

- Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Frimayanti, N., Mora, E., Dona, R., Rahmawati., Rosnita, D., and Zamri, A., 2022<sup>a</sup>. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian Molekular Docking Senyawa 4'-Metoksi Flavonol Sebagai Inhibitor Main Protease (M<sup>Pro</sup>) SARS-CoV-2. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 26(1), 8–14. <https://journal.unhas.ac.id/index.php/mff/article/view/18652>.
- Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Harlianti, T., and Zamri, A., 2019. Sintesis dan Potensi Aktivitas Tabir Surya Senyawa Analog Kalkon Turunan 3'-Hidroksiasetofenon dan 4-Metoksibenzaldehid. *Jurnal Photon*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.37859/jp.v10i1.1541>.
- Ikhtiarudin, I., Dona, R., Frimayanti, N., Utami, R., Susanti, E., Mentari, M., Nurmaida, N., Agistia, N., Herfindo, N., and Zamri, A., 2021. (E)-4-(3-(3-(4-Methoxyphenyl)Acryloyl)Phenoxy)Butyl 2-Hydroxybenzoate. *Molbank*, 2021, M1195. <https://doi.org/10.3390/M1195>.
- Ikhtiarudin, I., Dona, R., Frimayanti, N., Utami, R., Susanti, N., and Septama, A.W., 2022<sup>b</sup>. Sintesis, Karakterisasi Struktur, Dan Kajian Molecular Docking Senyawa Turunan 4'-Metoksi Flavonol Sebagai Antagonis Reseptor Estrogen Alpha (ER- $\alpha$ ) Pada Kanker Payudara. *Jurnal Riset Kimia*, 13(2), 236–248. <https://doi.org/10.25077/jrk.v13i2.553>.
- Ikhtiarudin, I., Frimayanti, N., Teruna., Hilwan, Y., and Zamri, A., 2017. Microwave-Assisted Synthesis, Molecular Docking Study and In Vitro Evaluation of Halogen Substituted Flavonols Against P388 Murine Leukemia Cells. *Applied Science and Technology*, 1(1), 375–381. <https://www.estech.org/index.php/IJSAT/article/view/61>.
- Ikhtiarudin, I., Lelani., Zamri, A., Teruna, H. Y., and Yuharmen., 2014. Sintesis dan Uji Toksisitas Senyawa Analog Kalkon Turunan 2'-Hidroksiasetofenon dan Halobenzaldehid. *Jurnal Photon*, 5(1), 57–63. <https://doi.org/10.37859/jp.v5i1.194>.
- Jasril, J., Frimayanti, N., and Ikhtiarudin, I., 2020. *In Silico Studies of Fluorinated Chalcone and Pyrazoline Analogues as Inhibitors for Cervical Cancer*. In: Mart, T., et Al. (Eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences. ISCPMS2019, 9-10 Juni 2019. *AIP Conference Proceedings*, 2242(1): 040008. <https://doi.org/10.1063/5.0009375>.
- Jo, S., Kim, S., Shin, D. H., and Kim, M. S., 2020. Inhibition of SARS-CoV 3CL Protease by Flavonoids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 145–151. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>.
- Lai, M. Y., Hsiu, S. L., Chen, C. C., Hou, Y. C., Chao, P. D., 2003. Urinary Pharmacokinetics of Baicalein, Wogonin and Their Glycosides After Oral Administration of Scutellariae Radix in Humans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), 79–83. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.79>.
- Latif, M. S., Rusdiana, T., and Gozali, D., 2017. Artikel Tinjauan: Pengaruh P-Glycoprotein (P-Gp) Terhadap Bioavailabilitas Atorvastatin. *Farmaka Suplemen*, 15(3), 1–6. <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/15418>.
- Liang, W., Huang, X., and Chen, W., 2017. The Effects of Baicalin and Baicalein on Cerebral Ischemia: A Review. *Aging Dis*, 8(6), 850–867. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0829>.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J., 2021. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- Mahgoub, R. E., Atatreh, N., and Ghattas, M. A., 2022. Chapter Three - Using filters in virtual screening: A comprehensive guide to minimize errors and maximize efficiency. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Academic Press, 59, 99–136. <https://doi.org/10.1016/bs.armac.2022.09.002>.
- Markham, K. R., 1988. *Cara mengidentifikasi flavonoid*. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Mohamed, N. M., Ali, E. M. H., and Aboulmagd, A. M., 2021. Ligand-Based Design, Molecular Dynamics and ADMET Studies of Suggested SARS-CoV-2 M<sup>Pro</sup> Inhibitors. *RSC Advances*, 11(8), 4523–4538. <https://doi.org/10.1039/d0ra10141a>.
- Muegge, I., Heald, S. L., and Brittelli, D., 2001. Simple Selection Criteria for Drug-Like Chemical Matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>.
- Nurlelari, N., Widyana, A., Julaha, E., Hardianto, A., Huspa, D. H. P., Maharani, R., Mayanti, T., Darwati, D., Hanafi, M., and Supratman, U., 2023. Studi In Silico Aktivitas Senyawa Steroid Terhadap Antikanker Payudara Menggunakan Estrogen Alfa (ER- $\alpha$ ). *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 19(1), 44–52. <https://doi.org/10.20961/alchemy.19.1.62384.44-52>.
- Ogu, C. C., and Maxa, J. L., 2000. Drug Interactions Due to Cytochrome P450. *Proceedings Baylor University*

- Medical Center*, 13(4), 421–423. <https://doi.org/10.1080/08998280.2000.11927719>.
- Pardridge, W. M., 1995. Transport of Small Molecules Through the Blood-Brain Barrier: Biology and Methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 15, 5–36. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00003-P](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00003-P).
- Phang-Lyn, S., and Llerena, V. A., 2023. *Biochemistry, Biotransformation*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/>> (diakses pada 4 Desember 2023).
- Razzaghi-Asl, N., Ebadi, A., Shahabipour, S., and Gholamin, D., 2021. Identification of a Potential SARS-CoV2 Inhibitor via Molecular Dynamics Simulations and Amino Acid Decomposition Analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6633–6648. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1797536>.
- Santoso, B., 2017. Pengaruh Volume Gridbox Pada Docking Senyawa dalam *Stelechocarpus burahol* Terhadap Protein Homolog Antiinflamasi TRPV1. In: Rahayu, H.S.E et al., (Eds), Proceeding 6<sup>th</sup> University Research Colloquium 2017: Seri MIPA dan Kesehatan. URECOL5, 9 September 2017. Universitas Muhammadiyah Magelang, Magelang, Indonesia, 321–328. <https://journal.unimma.ac.id/index.php/urecol/article/view/1369>.
- Sekiou, O., Bouziane, L., Frissou, N., Bouslama, Z., Honcharova, O., Djemel, A., and Benselhoub, A., 2020. In-Silico Identification of Potent Inhibitors of COVID-19 Main Protease (M<sup>Pro</sup>) from Natural Products. *International Journal of Biochemistry & Physiology*, 5(3), 000189. <https://doi.org/10.23880/ijbp-16000189>.
- Silva, A. M. S., Tavares, H. R., Barros, A. I. N. R. A., and Cavaleiro, J. A. S., 1997. NMR and Structural and Conformational Features of 2'-Hydroxychalcone and Flavones. *Spectroscopy Letters*, 30(8), 1655–1667. <https://doi.org/10.1080/00387019708006750>.
- Su, H., Yao, S., Zhao, W., Li, M., Liu, J., Shang, W., Xie, H., Ke, C., Hu, H., Gao, M., Yu, K., Liu, H., Shen, J., Tang, W., Zhang, L., Xiao, G., Ni, L., Wang, D., Zuo, J., Jiang, H., Bai, F., Wu, Y., Ye, Y., and Xu, Y., 2020. Anti-SARS-CoV-2 Activities in Vitro of Shuanghuanglian Preparations and Bioactive Ingredients. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1167–1177. <https://doi.org/10.1038%2Fs41401-020-0483-6>.
- Supratman, U., 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik: Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Widya Padjadjaran, Bandung.
- Taiming, L., and Xuehua, J., 2006. Investigation of the Absorption Mechanisms of Baicalin and Baicalein in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1326–1333. <https://doi.org/10.1002/jps.20593>.
- [UN] United Nation. 2023, *WHO chief declares end to COVID-19 as a global health emergency*. <<https://news.un.org/en/story/2023/05/1136367>> (diakses pada 19 Juli 2023).
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., and Kopple, K. D., 2002. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- Venugopal, P. P., and Chakraborty, D., 2021. Molecular Mechanism of Inhibition of COVID-19 Main Protease by  $\beta$ -Adrenoceptor Agonists and Adenosine Deaminase Inhibitors Using In Silico Methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080%2F07391102.2020.1868337>.
- [WHO] World Health Organization, 2020. *Coronavirus disease (COVID-19) pandemic*. <<https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>> (diakses pada 19 Juli 2023).
- Yu, Y., Pauli, G. F., Huang, L., Gan, L. S., van Breemen, R. B., Li, D., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., and Chen, S. N., 2020. Classification of Flavonoid Metabolomes via Data Mining and Quantification of Hydroxyl NMR Signals. *Analytical Chemistry*, 92(7), 4954–4962. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05084>.
- Zamri, A., Teruna, H. Y., and Ikhtiarudin, I., 2016. The Influences of Power Variations on Selectivity of Synthesis Reaction of 2'-Hydroxychalcone Analogue under Microwave Irradiation. *Molekul*, 11(2), 299–307. <http://dx.doi.org/10.20884/1.jm.2016.11.2.220>.
- Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., and Tsao, R., 2020. Molecular Mechanisms Underlying the Absorption of Aglycone and Glycosidic Flavonoids in a Caco-2 BBel Cell Model. *ACS Omega*, 5(19), 10782–10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>.
- Zhang, L., Zhou, L., Bao, L., Liu, J., Zhu, H., Lv, Q., Liu, R., Chen, W., Tong, W., Wei, Q., Xu, Y., Deng, W., Gao, H., Xue, J., Song, Z., Yu, P., Han, Y., Zhang, Y., Sun, X., Yu, X., and Qin, C., 2021. SARS-CoV-2 Crosses the Blood-Brain Barrier Accompanied with Basement Membrane Disruption without TIGHT JUNCTIONS Alteration. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 337. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00719-9>.