

VIRTUAL SKRINING SENYAWA TURUNAN FLAVONOID

**TERHADAP RESEPTOR MAIN PROTEASE, RNA DEPENDENT
RNA POLYMERASE DAN ANGIOTENSIN CONVERTING
ENZIM-2 PADA **COVID-19****

Dr. Ruswanto, M.Si.

Anindita Tri Kusuma P, M.Si.

Dr. Richa Mardianingrum, M.Si.

Adhitya Alif Pratama, S.Farm.



**VIRTUAL SKRINING SENYAWA TURUNAN FLAVONOID
TERHADAP RESEPTOR MAIN PROTEASE, RNA DEPENDENT
RNA POLYMERASE dan ANGIOTENSIN CONVERTING
ENZIM-2 PADA COVID-19**

Dr. Ruswanto, M.Si.
Anindita Tri Kusuma P., M.Si
Dr. Richa Mardianingrum, M.Si.
Adhitya Alif Pratama, S.Farm.



VIRTUAL SKRINING SENYAWA TURUNAN FLAVONOID TERHADAP RESEPTOR MAIN PROTEASE, RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE dan ANGIOTENSIN CONVERTING ENZIM-2 PADA COVID-19

Penulis:

Dr. Ruswanto, M.Si.
Anindita Tri Kusuma P., M.Si
Dr. Richa Mardianingrum, M.Si.
Adhitya Alif Pratama, S.Farm.

Editor:

Erik Santoso

Layouter :

Tim Kreatif PRCI

Cover:

Rusli

Cetakan Pertama : Januari 2024

Hak Cipta 2024, pada Penulis. Diterbitkan pertama kali oleh:

**Perkumpulan Rumah Cemerlang Indonesia
ANGGOTA IKAPI JAWA BARAT**

Pondok Karisma Residence Jalan Raflesia VI D.151
Panglayungan, Cipedes Tasikmalaya – 085223186009

Website : www.rcipress.rcipublisher.org
E-mail : rumahcemerlangindonesia@gmail.com

Copyright © 2024 by Perkumpulan Rumah Cemerlang Indonesia
All Right Reserved

- Cet. I – : Perkumpulan Rumah Cemerlang Indonesia, 2024
; 18 x 25cm
ISBN : 978-623-448-792-3

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang memperbanyak buku ini dalam bentuk dan dengan
cara apapun tanpa izin tertulis dari penulis dan penerbit

Undang-undang No.19 Tahun 2002 Tentang
Hak Cipta Pasal 72

Undang-undang No.19 Tahun 2002 Tentang Hak Cipta
Pasal 72

Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling sedikit 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp.1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta terkait sebagai dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

KATA PENGANTAR

Dengan rasa syukur yang mendalam, kami mempersembahkan buku berjudul "Virtual Skrining Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Reseptor Main Protease, RNA Dependent RNA Polymerase dan Angiotensin Converting Enzym-2 pada COVID-19". Buku ini merupakan hasil dari Kajian mendalam dan kolaborasi antar para peneliti yang berdedikasi di bidang biokimia, farmasi, dan teknologi informasi dalam upaya memerangi pandemi COVID-19.

Pandemi COVID-19 telah mengubah banyak aspek kehidupan kita. Dalam menghadapi tantangan ini, ilmu pengetahuan dan Kajian berperan penting dalam mencari solusi untuk mengatasi virus yang telah berdampak besar terhadap kesehatan global. Kajian tentang senyawa turunan flavonoid yang kami bahas dalam buku ini membuka jalan bagi pengembangan obat-obatan baru yang potensial dalam mengatasi virus SARS-CoV-2.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung terwujudnya publikasi ini, termasuk lembaga Kajian, universitas, dan semua individu yang terlibat langsung maupun tidak langsung dalam proses Kajian dan penulisan. Tidak lupa, kami juga menghaturkan apresiasi kepada para pembaca yang telah memberikan waktu dan minatnya terhadap karya ini.

Buku ini kami harapkan dapat memberikan kontribusi yang berarti bagi komunitas ilmiah dan masyarakat luas dalam memahami lebih dalam tentang potensi senyawa turunan flavonoid sebagai agen terapeutik dalam mengatasi COVID-19.

Penulis menyadari bahwa buku ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu diperlukan Kajian lebih lanjut untuk menunjang kekurangan yang ada pada skripsi ini.

Tasikmalaya, Januari 2024

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	I
DAFTAR ISI	III
BAB I PENGANTAR	1
 BAB II COVID-19, FLAVONOID DAN KAJIAN VIRTUAL SCREENING	 5
A. COVID-19	6
B. Flavonoid	7
C. Reseptor	11
1. ACE-2	11
2. Main protease	12
3. RdRp	13
D. Virtual screening	14
1. <i>MarvinSketch</i>	15
2. Protein Data Bank (PDB)	15
3. <i>Autodock</i>	15
4. <i>Discovery Studio Visualizer</i>	16
5. <i>Molegro</i>	16
6. <i>pkCSM</i>	16
7. <i>Pyrx-python 0.8</i>	17
8. <i>AmberTools Autodock 18.00</i>	17
 BAB III PROSES PEMECAHAN MASALAH	 18
1. Preparasi ligan	18
2. Preparasi reseptor	19
3. Identifikasi reseptor Target	19
4. Validasi Docking	19
5. Virtual Skrining dan <i>Docking</i> Ligan terhadap Reseptor Target	20
6. Simulasi <i>Molekular Dynamics</i>	20
7. Uji <i>pkCSM</i> dan Toksisitas	21
 BAB IV KAJIAN VIRTUAL SKRINING FLAVONOID PADA RESEPTOR COVID-19	 22
A. Molekular Docking	22

1. Identifikasi dan Analisa Reseptor	22
2. Preparasi Ligan dan Reseptor	25
3. Validasi Metode Docking	27
4. Virtual Screening	30
5. Visualisasi Hasil Docking	34
B. Simulasi Dinamika Molekul	43
C. Drugs Scan	51
D. Prediksi Profil Farmakokinetik dan Toksisitas	53
 DAFTAR PUSTAKA	 58
LAMPIRAN I PREPARASI LIGAN DAN RESEPTOR	66
LAMPIRAN II VALIDASI METODE DOCKING	68
LAMPIRAN III <i>VIRTUAL SCREENING</i>	70
LAMPIRAN IV VISUALISASI HASIL DOCKING	78
LAMPIRAN V MOLECULAR DOCKING	80
LAMPIRAN VI PREDIKSI PROFIL FARMAKOKINETIK DAN TOKSISITAS	89

BAB I

PENGANTAR

Pada akhir Desember 2019, terjadi wabah penyakit pneumonia yang tidak diketahui asal penyebabnya. Berawal dari kota Wuhan, provinsi Hubei, China. Menyebar dengan sangat cepat ke seluruh dunia. Peneliti di China sebelumnya menemukan virus yang tidak diketahui penyebabnya melalui penggunaan sekuensing yang tidak biasa dari sampel pasien dengan gejala penyakit seperti pneumonia. Virus ini bernama novel coronavirus (2019-nCoV) menyebabkan penyakit yang bernama COVID-19 yang dapat menular dari orang ke orang (Al-Khafaji et al., 2020). COVID-19 dapat dengan cepat berkembang menjadi akut sindrom gangguan pernapasan (ARDS) dan dalam beberapa kasus, menyebabkan disfungsi beberapa organ atau kematian. Mengingat tingkat penyebaran yang mengkhawatirkan dan tingkat keparahannya, COVID-19 dinyatakan sebagai darurat kesehatan masyarakat keprihatinan internasional pada 30 Januari 2020 dan dinyatakan sebagai pandemi pada 11 Maret 2020 oleh WHO (Kim et al., 2020).

Menurut data WHO per tanggal 24 September 2020 jumlah penderita 31.664.104 jiwa terinfeksi COVID-19, dengan angka kematian mencapai 990.000 jiwa. Di Indonesia pun sampai saat ini terus mengalami peningkatan kasus positif per tanggal 24 september terinfeksi 257,388 jiwa, dengan angka kematian 10,338 jiwa. Data di Indonesia sangat mengkhawatirkan dengan kasus positif yang terus bertambah, seiring dengan adanya era "*new normal*" (WHO, 2020).

Wabah penyakit seperti COVID-19 ini bukanlah merupakan kejadian yang pertama kali yang di alami oleh dunia ini, tahun 2012 Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) disebabkan oleh SARS-

coronavirus (SARS-CoV) dan penyakit Middle East Respiratory Syndrome (MERS) tahun 2012 disebabkan oleh MERS-Coronavirus (MERS-CoV) dengan total akumulatif kasus sekitar 10.000 (10.000-an kasus MERS dan 8000-an kasus SARS).

Senyawa metabolit sekunder merupakan sumber bahan kimia yang tidak akan pernah habis, sebagai sumber inovasi dalam penemuan dan pengembangan obat-obat baru ataupun untuk menunjang berbagai kepentingan industri. Berbagai jenis tumbuhan seperti akar rimpang temu ireng, temu putih, manggis, daun teh dan tumbuhan lainnya yang mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, steroid, terpenoid, saponin, dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan merupakan zat bioaktif yang berkaitan dengan kandungan kimia dalam tumbuhan, sehingga sebagian tumbuhan dapat digunakan sebagai bahan obat. Tanpa adanya suatu senyawa bioaktif dalam tumbuhan secara umum tumbuhan tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan obat (Redha, 2010).

Senyawa flavonoid pada umumnya memiliki aktivitas antioksidan, antivirus, anti alergi, anti kanker dan juga bersifat mampu menstabilkan membrane. Potensi antioksidan yang dimiliki berperan dalam mekanisme kerja sebagai esterogenik, antiinflamasi, antimutagenic, antiradical, antitumor, antikanker, antivirus dan sebagainya (Panche et al., 2016)

Komponen kandungan senyawa flavonoid seperti *orientoside*, *vitexin*, *meletin*, *cirsimatin*, dan *orientin-2-O-beta galactoside* ini telah terdeteksi memiliki karakteristik sebagai obat anti virus tetapi belum diuji secara kuantitatif. Ekstrak herbal atau jamu yang memiliki kandungan flavonoid di China Utara digunakan dalam pengobatan penyakit infeksi saluran pernafasan akut termasuk tonsilitas, faringitis, timpanitis akut dan limfangitis akut. Kandungan dari senyawa flavonoid

tersebut juga digunakan untuk pengobatan infeksi virus influenza dengan cara menghambat replikasi virus, meningkatkan fungsi kekebalan tubuh, dan meningkatkan sirkulasi darah. Selain itu, Kajian sebelumnya juga menunjukkan senyawa turunan flavonoid efektif dalam pengobatan influenza (H1N1) dan gejalanya, termasuk peradangan, batuk dan demam (Liu et al., 2018)

Berdasarkan Kajian Wilfred et.,all bahwa senyawa turunan flavonoid yaitu *hesperetin*, *myricetin*, *linebacker*, dan *caflanone* dapat mengikat reseptor ACE 2 dengan afinitas yang tinggi dibandingkan dengan *chloroquine*, yang menyebabkan perubahan konformasi untuk menghambat masuknya virus SARS-CoV-2. Sehingga, pada Kajian tersebut mempertimbangkan senyawa turunan flavonoid ini sebagai profilaksis terhadap virus SARS-CoV-2 (Ngwa et al., 2020)

Pada suatu Kajian baru-baru ini mengungkapkan bahwa protease utama COVID-19 bertanggung jawab atas mutase proteolitik virus ini dan sangat penting untuk siklus hidup virus ini. Jadi, penghambatan protease ini pada akhirnya akan mengarah pada penghancuran virus ini. Pada Kajian tersebut dilakukan *docking molekuler in silico* yaitu dilakukan dengan ligan asli dan 15 ligan berbasis fitokimia yaitu senyawa flavonoid dari *Calendula officinals*, untuk memeriksa afinitas tertinggi dilakukan *docking molekuler* untuk menganalisis sifat dinamika molekul untuk menganalisis sifat dinamis dan fleksibilitas konformasi atau stabilitas. Pada proses *docking in silico* menunjukkan bahwa senyawa utama *calendula officinals* yaitu *rutin*, *isorham-netin-3-ObD*, *calendoflaside*, *narcissin*, *calendulaglycoside B*, *calenduloside*, *calendoflavoside* berikatan lebih banyak energi ikatnya dibanding ligan aslinya (inhibitor N3). Secara keseluruhan pada Kajian *docking in silico* tersebut *caledoflaside* menunjukkan stabilitas dan fleksibitas yang lebih baik. Studi *in silico*

(*virtual molecular docking* dan simulasi dinamika molekul) menunjukkan bahwa senyawa molekul flavonoid berbasis *calendula* (*rutin*, *isorhamnetin-3-ObD*, *calendoflaside*) sangat berpengaruh untuk menghambat M-pro yang merupakan protease utama untuk SARS-CoV-2 yaitu penyebab penyakit mematikan COVID-19 (Das et al., 2020).

Pada Kajian lain juga telah melaporkan bahwa senyawa flavonoid dengan hasil awal menunjukkan aktivitas sebagai anti COVID-19. Pada Kajian tersebut disebutkan bahwa senyawa flavonoid dapat mengikat dengan afinitas tinggi protein lonjakan, helicase, dan protease pada reseptor ACE2 yang menyebabkan perubahan konformasi untuk menghambat masuknya SARS-CoV-2, dan juga disebutkan potensi untuk mempertimbangkan flavonoid ini sebagai profilaksis terhadap SARS-CoV-2 (Huang et al., 2020).

Akan tetapi, Kajian mengenai senyawa turunan flavonoid ini sangat terbatas atau bahkan belum ada yang mendapatkan hasil yang sesuai. Kebanyakan Kajian di Indonesia mengenai *docking* terhadap reseptor ACE2 lebih banyak meneliti efektivitas senyawa *chloroquine* dibandingkan dengan senyawa turunan flavonoid. Oleh karena itu, Kajian ini dilakukan untuk melihat efektivitas senyawa turunan flavonoid terhadap penghambatan virus SARS-CoV-2 pada reseptor ACE2.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka telah dilakukan virtual skrining flavonoid *docking molecular* dengan studi *in silico*. Dari Kajian ini diharapkan senyawa flavonoid dapat mempunyai interaksi yang stabil dengan reseptor COVID-19 sehingga senyawa flavonoid dapat dijadikan kandidat sebagai pengobatan COVID-19.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah yang ada dalam Kajian ini adalah: (1) Apakah senyawa turunan flavonoid mempunyai interaksi yang stabil dengan reseptor pada COVID-19; dan (2)

Apakah turunan senyawa flavonoid dapat digunakan sebagai kandidat pengobatan COVID-19?

Dari latar belakang dan masalah yang ada, maka tujuan dari Kajian yang diharapkan adalah: (1) Kajian ini dilakukan untuk mengetahui senyawa turunan flavonoid apakah senyawa tersebut mempunyai interaksi yang stabil dengan reseptor pada COVID-19 dan (2) Untuk mengetahui apakah senyawa flavonoid dapat dijadikan sebagai kandidat pengobatan COVID-19.

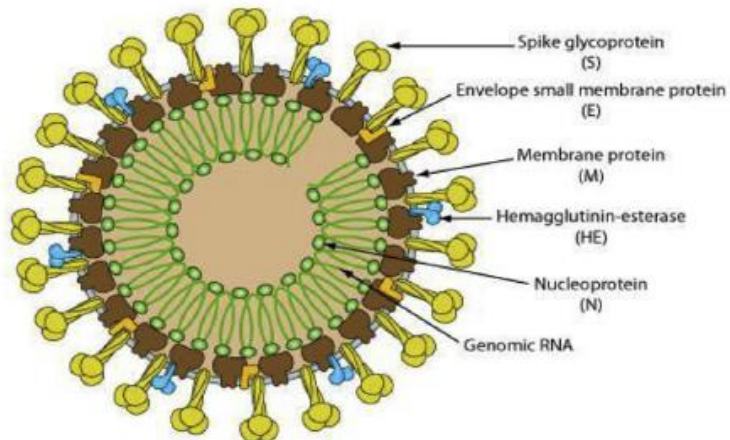
BAB II

COVID-19, FLAVONOID DAN KAJIAN VIRTUAL SCREENING

A. COVID-19

Secara umum, SARS-CoV-2 adalah virus RNA untai positif, replikasinya dipengaruhi oleh transkripsi multi-subunit kompleks protein non structural dengan panjang 30.000 bp, dan termasuk ke dalam *family Coronaviridae* dan genus *Betacoronavirus*, yang sangat mirip dengan SARS-CoV (Qiang et al., 2020). Dalam makromolekul SARS-CoV-2 poliprotein besar menyandingkan protease sistein yang disebut 3-chymotrypsin like protease (3CLpro) atau main protease (Mpro) yang penting untuk siklus hidup virus dari SARS-CoV-2 (Zhang et al., 2020). Enzim ini berperan penting dalam proses polyprotein virus, yang sangat diperlukan untuk pematangan virus (Hamza et al., 2020). Selanjutnya, RNA dependent RNA polymerase (RdRp) juga merupakan enzim yang sangat penting untuk replikasi virus SARS-CoV-2 (Gao et al., 2020). Karena mereka memiliki peran yang penting, protein ini dianggap sebagai target penting untuk mengembangkan antivirus senyawa melawan COVID-19.

Angiotensin Converting Enzim 2 (ACE-2) terkenal sebagai enzim yang memainkan peran utama system rennin-angiotensin (RAS) yang berhubungan dengan pengaturan fungsi jantung dan homeostatis tekanan darah. Masuknya SARS-CoV-2 ke dalam sel inang yaitu dimediasi oleh lonjakan glikoprotein, yang merupakan protein transmembrane permukaan di SARS-CoV-2. Oleh karena itu, ACE-2 manusia dianggap sebagai target utama untuk pengobatan COVID-19 dan untuk menghindari SARS-CoV-2 memasuki sel inang (Zhang et al., 2020)

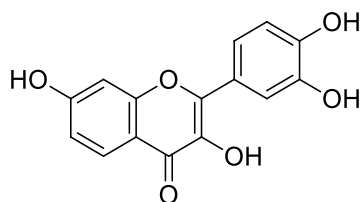


Gambar 2.1 Skema SARS-CoV-2

Sumber : (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020)

B. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan didalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Han et al., 2012). Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi atom karbon disekitar molekulnya (Redha, 2010).



Gambar 2.2 Struktur dasar flavonoid

Manfaat flavonoid yaitu sebagai berikut :

a. Pada tanaman

Flavonoid memberikan perlindungan dan sebagai pengatur pertumbuhan tanaman, serta perlindungan terhadap radiasi ultraviolet, daya tarik penyerbukan bunga terhadap serangga,

serta sebagai pengendali hormon (Vidak et al., 2015), (Gupta & Pulapalli, 2015).

b. Pada manusia

Flavonoid pada manusia berfungsi sebagai stimulan pada jantung, diuretik, menurunkan kadar gula darah, dan sebagai antijamur, diantaranya memiliki fungsi sebagai antibakteri, antiinflamasi, antitumor, antialergi, dan mencegah osteoporosis. Flavonoid dapat mencegah penyakit kardiovaskuler dengan cara menurunkan laju oksidasi lemak, karena peranannya sebagai antioksidan. Beberapa hasil Kajian menunjukkan bahwa flavonoid menurunkan hiperlipidemia pada manusia, dengan menghambatan oksidasi LDL pada kasus penyakit jantung oleh flavonoid, dapat mencegah pembentukan sel-sel busa dan kerusakan lipid (Nurjanah et al., 2012).

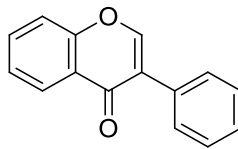
Flavonoid dapat menghambat replikasi virus influenza A dan juga gejalanya seperti demam, batuk, dan peradangan. Flavonoid juga dapat secara signifikan menghambat reproduksi dan stimulasi virus (Liu et al., 2018).

Senyawa turunan flavonoid juga diketahui bisa mengikat residu asam amino utama untuk penghambatan protease utama M-pro pada SARS-CoV-2. Pada Kajian *virtual docking molekuler* mengungkapkan bahwa tujuh senyawa bioaktif dari senyawa turunan flavonoid memiliki afinitas pengikatan yang lebih tinggi protease utama Mpro COVID-19, dan juga kemampuannya untuk membentuk kestabilan kompleks dengan Mpro, memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat protease utama sebagai anti COVID-19 (Das et al., 2020).

Derivatisasi flavonoid diantaranya terdiri dari isoflavon, flavonol, flavon, flavan-3-ol dan flavon. Menurut Koosha (2016) flavonoid terdiri dari lima subclass utama yaitu isoflavon, flavonol, flavon, flavan-3-ols, dan flavanon (Koosha et al., 2016)

1. Isoflavon

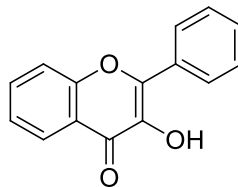
Isoflavon merupakan salah satu golongan senyawa polifenol atau flavonoid. Senyawa ini juga bersifat sebagai fitoestrogen karena kemampuannya berinteraksi dengan reseptor estrogen pada sel. Isoflavon membantu dalam mengurangi risiko penyakit jantung coroner, simpton menopause, penyakit prostat dan kanker (Sutir, 2012).



Gambar 2.3 Struktur dasar isoflavon

2. Flavonol

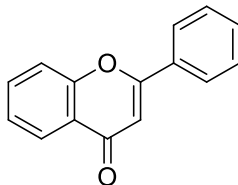
Flavonol merupakan subkelas flavonoid yang paling banyak ditemukan di alam. Flavonol terdiri atas *quersetin*, *kaemferol*, dan *mirisetin* dan merupakan contoh flavonol yang ditemukan dalam bentuk O-glikosida (Sutir, 2012).



Gambar 2.4 Struktur dasar flavonol

3. Flavon

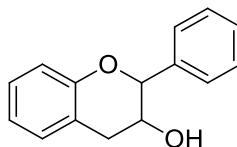
Flavon merupakan struktur fenolik yang mengandung satu gugus karbonil. Sumber utama flavon adalah sereal dan herbal. Flavon terdiri atas *apigenin* dan *luteolin*, hanya ditemukan pada bahan pangan tertentu. Flavon memiliki struktur yang serupa dengan flavonol (Koosha et al., 2016).



Gambar 2.5 Struktur dasar flavon

4. Flavan-3-ol

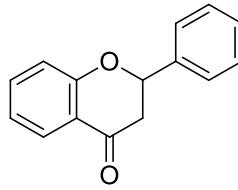
Flavan-3-ol merupakan subkelas flavonoid yang paling kompleks di mulai dari monomer sederhana diantaranya *katekin* dan polimer *proantosianidin* yang juga dikenal sebagai tannin terkondensasi.



Gambar 2.6 Struktur dasar flavan-3-ol

5. Flavanon

Flavanon adalah kelompok flavonoid yang ada dalam buah jeruk. Pada sebagian besar senyawa flavanon, cincin-C terhubung dengan cincin-B pada posisi C2 dengan konfigurasi-A. Flavon sangat reaktif dan telah dilaporkan dapat mengalami reaksi hidroksilasi, glikosilasi, dan O-metilasi (Koosha et al., 2016).

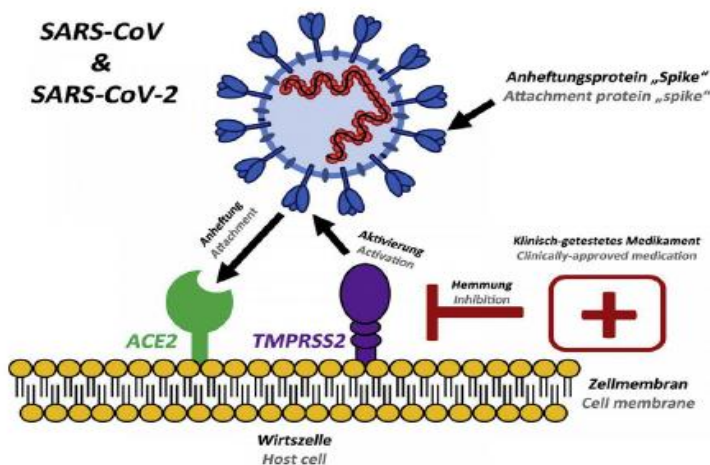


Gambar 2.7 Struktur dasar flavanon

C. Reseptor

1. ACE-2

ACE2 merupakan reseptor pada SARS-CoV-2. ACE2 sebagai reseptor untuk masuknya virus ke dalam sel inang. SARS-CoV-2 memiliki struktur 3-D yang hampir identik dengan domain ikatan reseptor yang mempertahankan ikatan Van der Waals. Protein spike dalam SARS-CoV-2 memiliki interaksi yang kuat dengan reseptor ACE2 pada manusia berdasarkan studi interaksi biokimia dan analisis struktur kristal. Sel-sel ini dapat berfungsi sebagai reservoir invasi virus yang menunjukkan bahwa ACE2 mengekspos ACE2 yang memfasilitasi virus corona di paru-paru. Ekspresi reseptor ACE2 juga ditemukan di banyak jaringan luar paru-paru termasuk jantung, ginjal, endothelium, dan usus (Zhang et al., 2020).



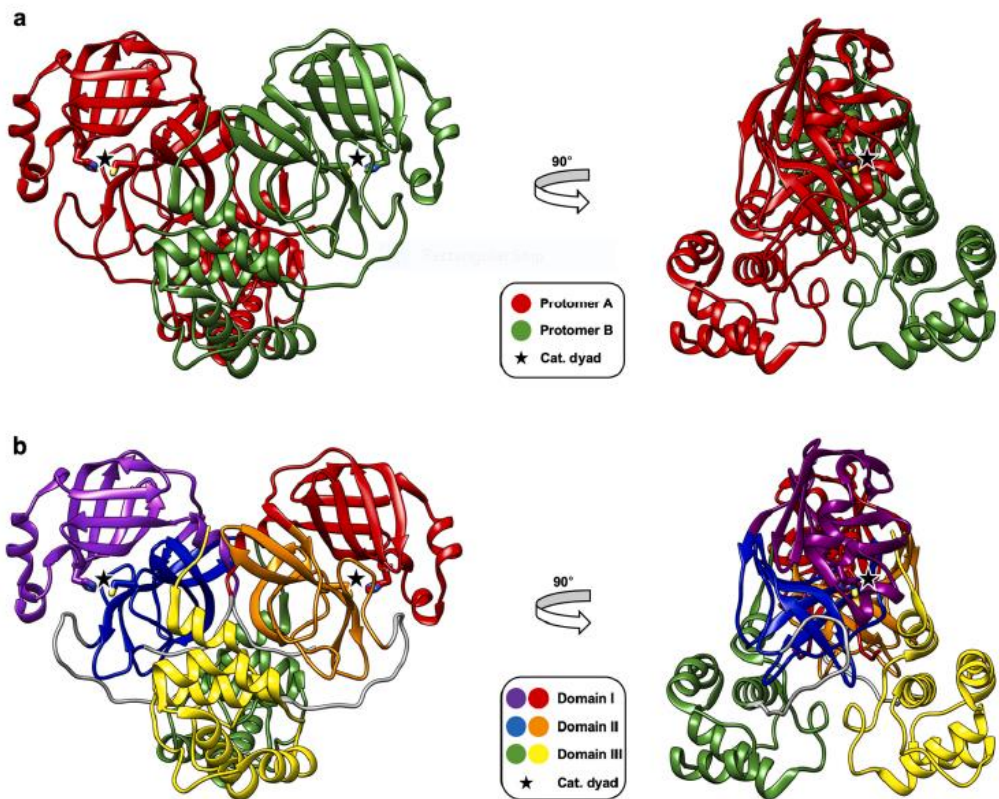
Gambar 2.8 Reseptor ACE2

Sumber : (Mousavizadeh & Ghasemi, 2020)

ACE2 dan TMPRSS2 diekspresikan di paru-paru dan cabang bronkial, pola ekspresi reseptor SARS-CoV-2 ACE2 dan serine protease dengan protein S-nya, TMPRSS2, dalam sel-sel individu di paru-paru dan di cabang bronkial subsegmental. Ekspresi TMPRSS2 di sel paru-paru jauh lebih kuat spesifisitasnya terhadap sel AT2 (Lukassen et al., 2020).

2. Main protease

Main protease (Mpro) atau chymotrypsin-like protease (3CLpro) dari COVID-19 merupakan target potensial untuk penghambatan replikasi SARS-CoV-2 yang sangat tinggi di konversi di antara virus COVID-19. Mpro SARS-CoV-2 memiliki 96% kesamaan untuk menghambat COVID-19 di dasar model homologi untuk SARS-CoV-2 Mpro dan docking simulasi 1903 senyawa obat kecil. Kesamaan 3D mode pengikatan dengan ligan yang diketahui dan evaluasi energi bebas yang mengikat (Khaerunnisa et al., 2020). Mpro adalah struktur dimer kompleks atau mirip dengan SARS-CoV dengan kecocokan urutan homologinya dengan desain inhibitor berbasis struktur terhadap SARS-CoV-2 Mpro. Mpro adalah tiga domain (domain I hingga III) protease sistein terlibat dalam pembelahan polyprotein precursor (Hatada et al., 2020).



Gambar 2.9 Struktur kristal homodimer Mpro dari SARS-CoV-2 (PDB : 6Y2F)

Sumber : (Ullrich & Nitsche, 2020)

3. RdRp

RdRp atau dikenal sebagai nsp12 merupakan RNA polymerase yang mengkatalisis sintesis RNA virus dan dengan demikian RdRp berperan penting dalam siklus replikasi dan transkripsi SARS-CoV-2 dengan bantuan dari nsp7 dan nsp8 sebagai *co factor*. RdRp adalah target utama dari banyak obat nukleotida, oleh karena itu, RdRp dianggap sebagai target utama untuk penghambat antivirus nukleotida yang menunjukkan potensi untuk pengobatan infeksi SARS-CoV-2. Struktur SARS-CoV-2 nsp12 berisi domain RdRp, struktur kompleks virus COVID-19 nsp12 mirip dengan SARS-CoV, struktur virus COVID-19 merupakan

blok structural dengan lima untai β dengan untai β anti-paralel dan dua helai. RdRp virus diperlukan oleh nukleotida penghenti rantai dimana RdRp berfungsi untuk mengenali dan menggabungkan bentuk aktif inhibitor ke dalam untai RNA yang sedang tumbuh (Gao et al., 2020).

SARS-CoV-2 RdRp atau juga dinamai dengan nsp12 merupakan sebuah kunci komponen mesin replikasi atau transkripsi. SARS-CoV RdRp terbentuk supercomplex seperti silinder berongga dengan nsp7 dan nsp8, yang memberikan prosesivitas ke RdRp, proses ini penting dalam proses mutasi genetik dan untuk mengontrol ketepatan dalam replikasi RNA (Pachetti et al., 2020).

Konsentrasi yang tinggi dari nsp12 kompleks memiliki efek untuk menstabilkan kompleks RNA dari suatu protein dan memiliki jumlah kompleks yang berlebih untuk melepaskan dari proses absorpsi nsp12 untuk memasuki SARS-CoV-2. Struktur kompleks RdRp berisi satu nsp12, satu nsp7 dan satu nsp8 (Yin et al., 2020).

D. Virtual screening

Proses penemuan dan pengembangan senyawa obat baru memerlukan waktu yang tidak sedikit terutama masih banyaknya tumbuhan-tumbuhan di seluruh dunia yang masih belum diteliti secara kimia dan farmakologi sehingga diperlukan metode Kajian yang tepat untuk menentukan dan mengembangkan senyawa dalam tumbuhan tersebut sebagai obat baru. Virtual skrining dipandang sebagai salah satu metode berbasis komputasi dalam penemuan dan pengembangan senyawa obat baru sehingga dalam prosesnya menjadi lebih cepat, efisien dan terarah. Dengan metode ini dapat di prediksi interaksi yang terjadi antara senyawa bioaktif dan protein target sehingga dapat memahami gambaran mekanisme kerjanya.

1. MarvinSketch

MarvinSketch adalah *software* buatan ChemAxon. *Software* ini dapat di unduh secara bebas dari chemaxon.com. *MarvinSketch* ditujukan untuk menggambar struktur molekul, reaksi kimia, menampilkan sifat-sifat dari struktur dan masih banyak lagi. Untuk versi yang gratis, tidak semua fungsi ini dapat dijalankan karena ada beberapa plugin yang harus kita unduh dari internet. Selain untuk fungsi menggambar, MarvinSketch juga dapat digunakan untuk menampilkan data koefisien partisi, protonasi, analisis topologi (Afiah.,2015).

2. Protein Data Bank (PDB)

Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>) adalah sebuah dokumen atau kumpulan data eksperimental struktur tiga dimensi dari makromolekul biologis, yang sekarang berjumlah lebih dari 32.500, termasuk protein dan asam nukleat. Molekul-molekul tersebut adalah molekul yang ditemukan di semua organisme termasuk bakteri, ragi, tanaman, lalat, hewan lain, dan manusia. Informasi ini dapat digunakan untuk membantu menyimpulkan peran struktur dalam kesehatan manusia dan penyakit, dan dalam pengembangan obat. Struktur yang terdapat dalam arsip ini mulai dari protein kecil dan potongan-potongan DNA sampai molekul kompleks seperti ribosom (RSCB., 2016).

3. Autodock

Autodock merupakan sebuah perangkat lunak yang dibangun untuk melakukan suatu prosedur dalam rangka memprediksi intraksi sebuah molekul kecil dari suatu senyawa dengan molekul target. Program ini bertujuan sebagai alat yang dapat digunakan pada komputer untuk membantu proses pembentukan interaksi yang akurat. Setiap proses

docking dengan *Autodock* membutuhkan paling sedikit empat input file yaitu PDBQT file untuk ligan, PDBQT file untuk reseptor atau protein, *grid parameter file* (GPF) dan *docking parameter file* (DPF) untuk perhitungan oleh *Autodock* (Yanuar.,2012).

4. Discovery Studio Visualizer

Discovery Studio Visualizer merupakan penampil gratis yang digunakan untuk membuka, mengedit serta *software* untuk melakukan analisis data yang dihasilkan oleh perangkat lunak lain. Perangkat ini dirancang untuk memberikan gambaran *interaktif* untuk melihat dan mengedit struktur molekul, urutan data *refleksi X-ray*, *script* dan data lainnya (Saleh., 2015).

5. Molegro

Molekular docking adalah alat utama dalam biologi *molecular structural* dengan bantuan komputer untuk desain suatu obat. Tujuan dari *docking* protein dan ligan yaitu untuk memprediksi model yang mengikat ligan pada daerah yang dominan. *Molegro Virtual Docker* digunakan untuk pemodelan molekuler pada *workstation* dengan *prosesor dual core* (Puspaningtyas et al., 2012).

6. pkCSM

pkCSM merupakan prediksi kecil profil farmakokinetik dari suatu molekul dan profil toksisitas dengan menggunakan grafik sebagai parameter *pkCSM*. Perkembangan obat memiliki tingkat peralihan yang tinggi, dengan farmakokinetik yang buruk dan sifat keamanan yang menjadi parameter signifikan. Pendekatan komputasi dapat membantu meminimalisir resiko yang terjadi. *pkCSM* dapat digunakan sebagai model

prediksi sifat *ADMET* dalam pengembangan suatu obat baru (Pires & D, 2015).

7. Pyrx-python 0.8

Pyrx-python adalah aplikasi untuk mempersiapkan dan menganalisis virtual skrining. Penggunaan dari *raccoon* dapat memilih ligan dan reseptor yang telah di preparasi, kemudian dapat mengkonfigurasi opsi *docking*, memvisualisasikan situs pengikatan dan menyambungkan ke dalam suatu kluster untuk melakukan proses virtual skrining (Temelkovski & Terstyanszky, 2017).

8. AmberTools Autodock 18.00

AmberTools merupakan rangkain program yang digunakan untuk melakukan simulasi dinamika molecular, terutama pada suatu biomolekul. Rangkain perangkat lunak *AmberTools* dibagi menjadi 2 bagian, salah satu nya *AmberTools* 18, merupakan kumpulan program yang ditujukan untuk simulasi dinamika molecular yang berpusat disekitar program simulasi *pmemd*, dan lebih signifikan dari versi *AmberTools* sebelumnya yaitu *AmberTools* 18 (Case et al., 2018).

BAB III

PROSES PEMECAHAN MASALAH

Peralatan yang digunakan berupa perangkat keras dan lunak. Perangkat keras yang digunakan berupa personal computer dengan spesifikasi *Both the molecular docking and dynamics simulation were carried out using a supercomputer equipped intel socket LGA1151, PCIE 3.0, good capacitors + Intel i5 Quad cores (4 cores/4 threads) 3.4 GHz, the latest Kaby Lake processor, operating system* serta perangkat lunak yang digunakan seperti *AutodockTools-1.5.6, Pyrx-Python 0.8, MarvinSketch versi 5.2.5.0, Discovery Studio version 16.1, AmberTools versi 18.00, Molegro* dan beberapa program berbasis web seperti *Pubchem, Protein Data Bank (PDB)* dan *pkCSM*.

Bahan yang digunakan untuk Kajian ini adalah senyawa turunan flavonoid yang terdapat pada *biopurify phytochemicals* (terdapat dalam lampiran), reseptor ACE 2, RNA defendant RNA Polymerase dan Main Protease.

1. Preparasi ligan

Ligand dapat di unduh pada *pubchem* melalui website <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan juga *Zincdatabase* (<https://zinc.docking.org/substances/home/>) kemudian di klik *tools* dan lakukan protonasi pada pH 7,4 sesuai dengan pH darah, dan konformasi pada struktur turunan flavonoid menggunakan *software MarvinSketch* versi 5.2.5.0 dari *chemaxon*. Struktur yang sudah di preparasi kemudian disimpan dengan format *file .mol2* (Purnomo,2013).

2. Preparasi reseptor

Reseptor Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) dengan kode PDB (PDB ID 6LZG), reseptor Main protease (PDB ID 6ZRU), dan reseptor RNA dependent RNA Polymerase (PDB ID 7CTT) diunduh dari protein data bank melalui *website* <http://www.rcsb.org/> dalam format pdb. Kemudian reseptor tersebut dilakukan proses optimasi untuk menghilangkan molekul air dan penambahan atom hydrogen dengan menggunakan *software AutodockTools* 1.5.6. selanjutnya hasil optimasi disimpan dalam format pdb (Ruswanto et al., 2018).

3. Identifikasi reseptor Target

Analisis reseptor target dilakukan dengan melihat profil protein PDB dengan kode 6LZG, 6ZRU, 7CTT pada *website* <http://www.ebj.ac.uk/pdbsum>. Hasil analisis reseptor yang digunakan untuk melihat bahwa protein yang digunakan baik adalah sesuai dengan plot Ramachandran (Ruswanto et al., 2018).

4. Validasi Docking

Program *Autodock* divalidasi untuk mendapat metode yang dapat dipercaya. Protein reseptor yang telah di unduh ini kemudian dipilih ligan alaminya untuk proses validasi metode *docking*. Parameter yang diperoleh apabila metodenya valid adalah nilai RMSD, dan parameter Lipinski diantaranya Log P, berat molekul, donor dan akseptor hydrogen, dan juga refractory molar. Metode validasi *docking* dikatakan baik jika nilai RMSD yang dihasilkan ≤ 2 , lalu nilai Log P rentangnya -4 sampai -5, dan BM nya ≤ 500 , dan juga untuk refractory molar dengan nilai yang diperbolehkan antara 40-130. Jika nilai RMSD yang diperoleh ≥ 2 maka metode yang digunakan tidak dapat dipercaya (Ruswanto et al., 2017).

5. Virtual Skrining dan *Docking* Ligan terhadap Reseptor Target

Ligan yang sudah di preparasi dioptimalkan dan dikonversi dari format *file* .mol2 ke format *file* PDBQT dengan menggunakan *AutodockTools-1.5.6*. Proses Virtual Skrining semua senyawa turunan flavonoid dilakukan melalui *software* *Racoon* dan *MGLTools Autodock-1.5.7* sebagai alat untuk proses *docking*. Konfigurasi untuk file parameter *grid* dan *docking* dibuat menggunakan *Autodock. Autodock* dan *autogrid* yang terintegrasi dengan *Autodock4* digunakan untuk menghasilkan *grid maps* untuk setiap atom ligand. Analisis tiap ligand di atur dalam *default docking* dan dijalankan LGA untuk 100 running pada tiap ligan. File parameter *grid* juga digunakan untuk memprediksi residu asam amino pada situs aktif reseptor target yang berinteraksi dengan ligan (Umesh et al., 2020).

6. Simulasi *Molekular Dynamics*

Struktur kompleks reseptor ACE 2 ,Mpro dan RdRp dengan kandidat molekul turunan flavonoid terbaik disiapkan untuk dilakukan proses simulasi *Molekular dynamics* menggunakan *software* *AmberTools versi 18.00*. *AmberTools versi 18.00* dengan air model TIP3P proses minimalisasi dilakukan dengan menggunakan metode *steepest descent* dan *gradient konjugasi*. Semua ligan yang disiapkan kemudian dipilih konformasi terbaik dari hasil penambatan pada proses virtual screening. Konformasi tersebut diperoleh dari *file.dlg* setiap ligan hasil penambatan. Berkas *file.dlg* dibuka menggunakan *AutodockTools- 1.5.6*, kemudian konformasi dengan energy ikatan terendah disimpan dalam bentuk *file.pdbqt*. Selanjutnya berkas *file.pdbqt* dibuka menggunakan *Discovery Studio versi 16.1* kemudian dilakukan penambahan hydrogen dan disimpan dalam berkas *file.pdb*.

Protein yang digunakan dalam simulasi dinamika molekul adalah protein yang sama pada saat penambatan molekuler. Protein dibuka menggunakan Discovery Studio versi 16.1 kemudian ditambahkan hydrogen dan disimpan dalam berkas *file.pdb*. Protein yang dipreparasi dalam format *file.pdb* tidak kompatibel dengan program amber sehingga perlu adanya modifikasi pada protein tersebut. Modifikasi dilakukan menggunakan program *pdb4amber* menghasilkan output protein yang dapat terbaca pada program LEaP Amber. Program *pdb4amber* juga dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya atom yang hilang (*Missing Atom*) pada protein (Amber 2020 & (Hariono et al., 2020).

7. Uji *pkCSM* dan Toksisitas

Pengujian profil farmakokinetik berbasis *pkCSM* dapat melalui *server website* yang diakses secara bebas melalui laman (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsml>) (Pires & D, 2015).

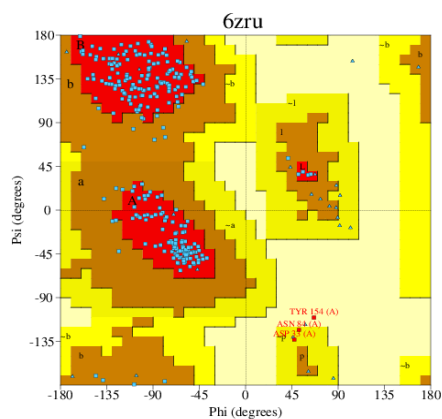
BAB IV

KAJIAN VIRTUAL SKRINING FLAVONOID PADA RESEPTOR COVID-19

A. Molekular Docking

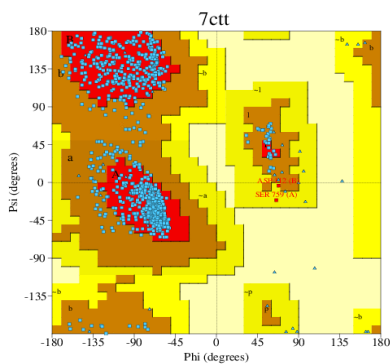
1. Identifikasi dan Analisa Reseptor

Analisis reseptor dilakukan dengan melihat profil protein pada plot ramacandran melalui website www.ebi.ac.uk/pdbsum. Plot ramacandran digunakan sebagai parameter untuk mengetahui kualitas dan kestabilan dari suatu struktur protein. Setiap asam amino penyusun protein akan memiliki satu sudut phi dan psi sehingga setiap residu asam amino dapat digambarkan sebagai satu plot atau koordinat dalam plot ramachandran. Suatu struktur protein dikatakan stabil ketika jumlah plot residu *most favoured regions* lebih dari 50%, sedangkan pada *disallowed regions* kurang dari 15%, dan semakin kecil nilai persentasenya maka kuantitas struktur protein akan semakin baik. Hal ini disebabkan karena residu asam amino non glisin pada daerah tersebut menyebabkan obstruksi sterik yang dapat mengganggu konformasi protein untuk membentuk ikatan yang stabil dengan ligan (Lovell et al.,2013; Ruswanto et al.,2018)



	No. of residues	%-tage
Most favoured regions [A,B,L]	238	90.5%
Additional allowed regions [a,b,l,p]	22	8.4%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	2	0.8%
Disallowed regions [XX]	1	0.4%*
Non-glycine and non-proline residues	263	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Glycine residues	26	

(a)



	No. of residues	%-tage
Most favoured regions [A,B,L]	801	85.0%*
Additional allowed regions [a,b,l,p]	139	14.8%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	2	0.2%
Disallowed regions [XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline residues	942	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	13	
Glycine residues	43	
Proline residues	33	
Total number of residues	1031	

(b)