

***In Silico* Study of Bioactive Compounds in Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) toward Angiotensin Converting Enzyme (ACE) as target for hypertension**

Aurelina Yunita Hess¹, Siti Zhahira Ramadhani¹, Rifa Nurfadila Andhryanti¹, Noor Zhafirah¹, Fajar Oktavian Muljono¹, Firghi Muhammad Fardhan¹, Dhanial Novitasari²✉

¹Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung Sumedang KM 21 Telp. (022)7796200 Jatinangor 45363

²Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung Sumedang KM 21 Telp. (022)7796200 Jatinangor 45363

Info Artikel

Diterima : 09-07-2024
Disetujui : 27-08-2024
Dipublikasikan : 25-11-2024

Keywords:

High blood pressure
Guava leaves
Computational study
Molecular Docking

Abstrak

Hipertensi merupakan suatu keadaan medis kronis yang terjadi apabila tekanan darah melebihi batas normal, sehingga dapat meningkatkan risiko komplikasi penyakit lain yang terkait dengan jantung. Terapi penanganan hipertensi saat ini sebagian besar menggunakan obat golongan *angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi)*. Salah satu bahan alam yang memiliki potensi menurunkan tekanan darah ialah daun dari jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang sudah diketahui mengandung metabolit bioaktif flavonoid, fenolik, dan alkaloid. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji senyawa aktif yang terdapat pada daun jambu biji terhadap interaksi secara molekuler pada protein ACE dengan pendekatan studi komputasi. Metode yang digunakan dalam pengujian ini meliputi karakteristik *drug likeness* berdasarkan kaidah Lipinski, prediksi profil ADMET, penapisan farmakofor, dan penambatan molekul. Hasil studi menunjukkan senyawa asam klorogenat dan luteolin yang terkandung pada daun jambu biji memiliki interaksi baik dengan protein target ACE berdasarkan energi ikatan dan kesamaan interaksi residu amino dengan ligan alaminya. Oleh karena itu, daun biji dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat berbasis bahan alam untuk membantu dalam manajemen terapi hipertensi.

Abstract

Hypertension defines as a chronic medical condition that occurs when blood pressure exceeds normal limits, increasing the risk of complications from heart-related diseases. Current hypertension treatment therapy mostly uses angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi). One of the natural resources that has the potential to reduce blood pressure is the leaves of guava (*Psidium guajava* L.) which are known to contain bioactive flavonoid, phenolic, and alkaloid compounds. The current study aims to evaluate the active compounds contained in guava leaves in molecular interactions with ACE proteins using *in silico* approach. Drug likeness characteristics based on Lipinski's rules, ADMET profile prediction, pharmacophore screening, and molecular docking were utilized for this study. Our findings suggested that chlorogenic acid and luteolin compounds contained in guava leaves have good interactions with ACE based on binding energy and similarity of amino residue interactions with their native ligands. Therefore, guava leaves can be further developed as natural material-based candidates to be used in the therapeutic management of hypertension.

© 2024 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Jalan Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor, Jawa Barat 45363
E-mail: dhanial@unpad.ac.id

p-ISSN 2252-6951
e-ISSN 2502-6844

Pendahuluan

Hipertensi ialah suatu kondisi medis yang terjadi saat tekanan darah pada pembuluh darah arteri mengalami peningkatan secara abnormal dan terus menerus. Kondisi ini dapat diakibatkan oleh berbagai faktor, dengan faktor resiko utamanya adalah gangguan fungsi jantung sebagaimana mestinya yang bekerja mempertahankan tekanan darah normal (Wulandari, *dkk.*, 2023). Gangguan tersebut menyebabkan jantung perlu bekerja lebih berat dalam memompa darah pada sistem peredaran darah ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah. Seseorang dikategorikan memiliki hipertensi jika tekanan darah sistolik orang tersebut mencapai atau melebihi 140 mmHg dan atau tekanan darah diastoliknya mencapai atau melebihi 90 mmHg (Kemenkes RI, 2021). Berdasarkan data Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2021, diperkirakan sekitar 1,28 miliar orang dewasa di dunia memiliki kondisi hipertensi, terlebih orang dewasa yang berada di negara-negara dengan perekonomian menengah ke bawah. Pada tahun 2020, prevalensi hipertensi di Asia Tenggara mencapai 39,9% dari seluruh penduduk di negara-negara tersebut. Menurut data Riset Kesehatan Dasar pada tahun 2018, prevalensi hipertensi di Indonesia mencapai 34,1% dari 260 juta penduduk (Destra, *dkk.*, 2022; Laurensia, *dkk.*, 2022).

Sebagian besar pedoman penatalaksanaan hipertensi saat ini merekomendasikan terapi dengan obat golongan *angiotensin converting enzyme inhibitors* (ACEi). *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) merupakan zink terglisosilasi dipeptidyl-karboksi peptidase yang menjadi komponen utama sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAAS). Enzim ini mengubah hormon angiotensin I menjadi vasokonstriktor aktif angiotensin II yang mana secara tidak langsung menyebabkan penyempitan pembuluh darah, sehingga tekanan darah pada pembuluh darah akan mengalami peningkatan (Gielen, *dkk.*, 2015). Obat kelas ACEi merupakan obat yang memiliki aktivitas sebagai penghambat reseptor ACE pada RAAS, sehingga efek vasokonstriksi tidak terjadi akibat tidak terbentuknya angiotensin II (Gielen, *dkk.*, 2015). Penghambatan ACE menyebabkan vasodilatasi yang berpengaruh pada penurunan tekanan darah. Selain itu, penghambatan ACE juga menurunkan sekresi aldosteron yang berpengaruh pada meningkatnya reabsorpsi air dan sodium pada ginjal yang diiringi juga dengan adanya retensi kalium (Nafrialdi, 2007).

Sejumlah senyawa dan ekstrak dari tumbuhan sudah terbukti memberikan aktivitas biologis dalam penurunan tekanan darah. Hal ini salah satunya disebabkan oleh molekul turunan senyawa flavonoid yang dapat mencapai ke pusat aktif ACE. Flavonoid sendiri memiliki aktivitas farmakologi yang luas sehingga dapat membantu menjaga kesehatan dan mengurangi risiko terjadinya berbagai macam penyakit, terlebih untuk senyawa flavonol yang sudah diteliti secara luas sebagai agen antihipertensi. Senyawa flavonol mampu mengurangi stres oksidatif, menghambat aktivitas reseptor ACE, meningkatkan relaksasi endotel pembuluh darah, serta mengatur persinyalan sel dan ekspresi gen (Solekha, *dkk.*, 2023). Terlepas dari banyak penelitian yang sudah dilakukan, kebutuhan akan sumber bahan alam serta material yang digunakan untuk membuktikan aktivitas biologis pada hewan atau sel uji masih menjadi salah satu keterbatasan dalam penelitian. Oleh karena itu, studi komputasi dianggap menjadi salah satu pendekatan yang dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan bahan alam yang memiliki efek farmakologis, salah satunya terkait dengan prediksi interaksi molekulernya karena dapat dikerjakan dalam waktu tidak lama serta sudah banyak akses perangkat yang gratis dan mudah didapatkan untuk keperluan penelitian. Studi *in silico* telah dilakukan sebelumnya terhadap reseptor ACE menggunakan senyawa dari bahan alam, salah satunya adalah penelitian oleh Tilaqza dan Herbani (2021) yang meneliti aktivitas senyawa bioaktif dalam daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) sebagai senyawa uji, dengan captopril sebagai senyawa pembanding. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, senyawa yang memiliki interaksi paling menyerupai pembanding adalah kuersetin, kaempferol, dan beta-kariofilen. Sementara itu, senyawa dengan energi ikatan paling rendah untuk berinteraksi dengan ACE adalah kaempferol dan beta-sitosterol. Adanya hasil penelitian tersebut menunjukkan potensi dari pemanfaatan studi komputasi dalam mencari kandidat bahan alam tertarget pada ACE untuk diteliti lebih lanjut efeknya dalam penurunan tekanan darah.

Jambu biji (*Psidium guajava* L.) merupakan tanaman dari famili Myrtaceae yang selain dimanfaatkan sebagai makanan, juga dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Tanaman ini kaya akan kandungan flavonoid, flavonool, dan alkaloid yang memiliki banyak aktivitas farmakologis, sehingga tanaman ini sering dianggap sebagai tanaman obat serbaguna (Taha *dkk.*, 2019). Anggapan terhadap tanaman jambu biji ini dikarenakan banyak bagian dari tanamannya yang memiliki banyak khasiat obat, seperti bagian akar, daun, buah, dan kulit batang. Ekstrak air daun jambu biji sendiri diketahui memiliki efek farmakologis sebagai antiinflamasi, analgesik, antidiabetes, dan antihipertensi (Ironi, *dkk.*, 2016). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jambu biji secara intravena (50–800 mg/kg) berpotensi sebagai kandidat antihipertensi yang efektif pada tikus hipertensi yang sensitif terhadap garam Dahl karena efeknya dalam penurunan tekanan darah yang signifikan (Braga, *dkk.*, 2022). Akan tetapi, mekanisme molekuler yang berperan dalam aktivitas tersebut masih belum diketahui. Berdasarkan temuan yang sudah ada, maka studi ini bertujuan untuk mengevaluasi senyawa bioaktif dalam daun jambu biji yang memiliki potensi sebagai kandidat obat antihipertensi dengan mekanisme tertarget pada protein ACE. Hasil studi ini

diharapkan dapat menambah bukti saintifik terkait potensi daun jambu biji untuk penelitian kedepannya sebagai kandidat penurun tekanan darah berbasis tanaman medisinal.

Metode

Penelitian diawali dengan studi literatur untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam daun jambu biji. Senyawa-senyawa aktif yang diperoleh kemudian dikerucutkan berdasarkan aktivitas farmakologinya, sehingga dapat diketahui senyawa-senyawa aktif yang memiliki efek dalam mengatasi hipertensi dan ditetapkan sebagai senyawa uji dalam penelitian ini. Penentuan reseptor serta ligan alami yang akan digunakan dalam penelitian juga dapat dilakukan melalui studi literatur.

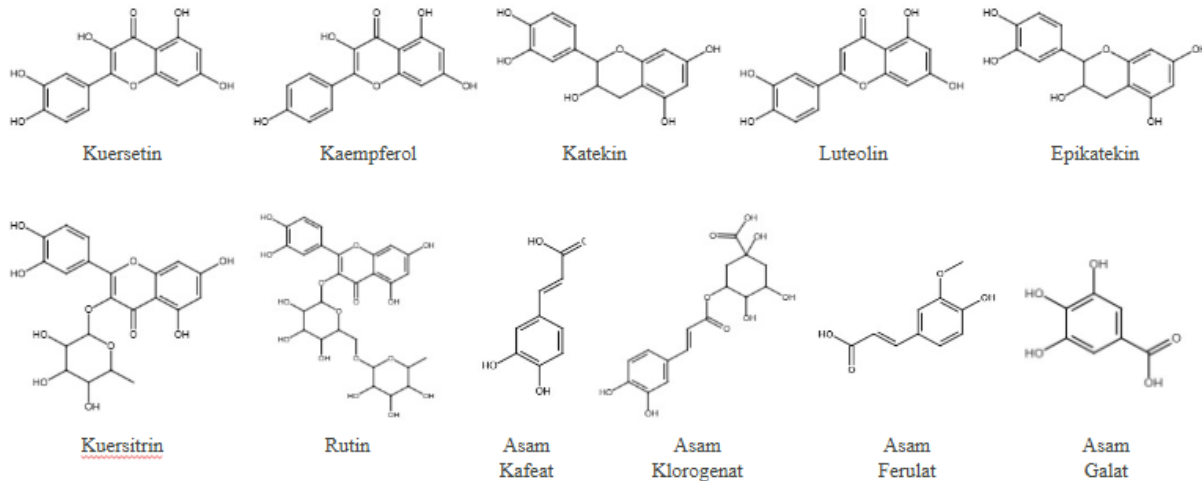
Senyawa uji berupa senyawa-senyawa aktif dari daun jambu biji dilakukan prediksi *Lipinski's Rule of 5* (RO5) yang dilakukan dengan menggambar struktur atau memasukkan format canonical SMILES senyawa uji berdasarkan informasi dari Pubchem *database* ke dalam situs Mcule (<https://mcule.com/apps/property-calculator/>). Hasil yang diperoleh berupa data-data fisikokimia senyawa-senyawa tersebut lalu dievaluasi berdasarkan berat molekul, nilai Log P, jumlah donor ikatan hidrogen, dan jumlah akseptor ikatan hidrogen. Senyawa uji juga dilakukan prediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADME-T) pada situs PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/adme/>). Senyawa uji diinput dalam format MOLfile ke situs PreADMET. Kemudian, dilakukan pengamatan dengan mempertimbangkan nilai HIA dan CaCO₂ dalam profil penyerapan, nilai *protein plasma binding* (PPB) dan *blood brain barrier* (BBB) dalam profil distribusi, serta potensi mutagenik dan karsinogenik dalam profil toksisitas (Lee dkk., 2003).

Selanjutnya, untuk prediksi gugus farmakofor dari senyawa uji terhadap target protein ACE, dilakukan penapisan farmakofor menggunakan aplikasi *LigandScout* versi 4.5. Preparasi yang dilakukan sebelum penapisan farmakofor adalah mengunduh ACE target aktif dan *decoy* dalam bentuk SDF pada situs Dud.e (<https://dude.docking.org/targets>) dengan kode PDB ID 3BKL, serta senyawa uji dalam bentuk SDF pada situs PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pengaturan selanjutnya dilakukan pada aplikasi BIOVIA *Discovery Studio* untuk target aktif sebanyak 100 dan untuk *decoy* sebanyak 400, kemudian disimpan dalam bentuk SDF. Selanjutnya, dilakukan pemodelan 10 model farmakofor dan ditinjau kurva receiving operating characteristics (ROC) yang dihasilkan untuk digunakan pada penapisan terhadap senyawa uji.

Potensi senyawa metabolit sekunder daun jambu biji sebagai agen terapi hipertensi yang berinteraksi dengan reseptor *human angiotensin converting enzyme* dapat diketahui melalui *molecular docking*. Untuk melakukan penambatan molekuler, digunakan aplikasi AutoDock 4.2.6 untuk proses *running* dan BIOVIA *Discovery Studio* untuk visualisasi hasil interaksi ikatan. Keseluruhan proses tersebut dilakukan pada perangkat berupa laptop Lenovo IdeaPad Flex 5 dengan spesifikasi 14ALC05 AMD Ryzen 5 5500U 2.10 GHz. Proses *docking* membutuhkan *working folder* program Autodock, reseptor, serta ligan uji yang sudah dipreparasi dalam format pdbqt. Preparasi reseptor dilakukan dengan mengunduh protein yang sesuai dengan target reseptor pada situs *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) dengan PDB ID 1O86, lalu dipisahkan menggunakan BIOVIA *Discovery Studio* v24.1.0.23298 untuk diunduh dalam format PDB. Struktur reseptor ditambahkan atom hidrogen polar dan muatan Kollman menggunakan aplikasi AutoDock, sedangkan struktur ligan ditambahkan atom hidrogen dan *merge* menjadi nonpolar kemudian memberikan muatan *Compute Gasteiger*. Setelah reseptor dan ligan dipreparasi, dilakukan simulasi *molecular docking* pada senyawa uji dan senyawa pembanding berupa lisinopril dengan aplikasi yang sama. Pendefinisian ligan dan reseptor dilakukan terlebih dahulu, kemudian ditetapkannya ukuran *grid box* sebesar 40 × 40 × 40 pada jarak 0,375 Å, dengan koordinat pusat *grid box* yakni x = 40.935, y = 32.383, dan z = 47.286. Selanjutnya, dilakukan implementasi hasil melalui 100 *running* Genetic Algorithm Lamarckian. Hasil dari simulasi *molecular docking* dapat dianalisis menggunakan *command prompt* (cmd) dan memasukkan *file address* folder berisi autogrid4, autodock4, dan ligan serta reseptornya. Analisis hasil dilakukan dengan melihat parameter *binding affinity* (Energi bebas Gibbs), konstanta inhibisi, dan kesamaan interaksi pada residu asam amino. Visualisasi interaksi ikatan antara ligan dengan residu asam amino dari reseptor ACE dilakukan menggunakan *BIOVIA Discovery Studio*.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Irondi, *dkk.*, (2016), daun jambu biji memiliki aktivitas farmakologi yang bermanfaat untuk mengatasi hipertensi. Analisis secara HPLC-DAD menunjukkan bahwa daun jambu biji memiliki kandungan senyawa aktif golongan flavonoid yang dapat berpotensi mengatasi hipertensi berupa kuersetin, kaempferol, katekin, kuersitrin, rutin, luteolin, epikatekin, asam kafeat, asam klorogenat, dan asam galat (Gambar 1).



Gambar 1. Senyawa bioaktif dalam daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) berdasarkan studi Irondi *dkk.* (2016).

Lipinski's Rule of Five (RO5), atau disebut juga hukum Lipinski, merupakan parameter dalam menganalisis sifat fisikokimia suatu senyawa yang mana melihat kemampuan permeabilitasnya dalam difusi pasif. Hukum ini juga digunakan untuk mempertimbangkan senyawa obat untuk diadministrasikan secara oral. Senyawa uji dikatakan telah memenuhi persyaratan untuk dibentuk sediaan oral apabila tidak melanggar lebih dari satu aturan pada hukum Lipinski (Lipinski, *dkk.*, 2004). Hasil skrining hukum Lipinski terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam daun jambu biji dapat dilihat pada Tabel 1. Sembilan dari sebelas senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji (kuersetin, kaempferol, katekin, luteolin, epikatekin, asam kafeat, asam klorogenat, asam galat, dan asam ferulat) dapat dijadikan kandidat sebagai sediaan oral karena memenuhi aturan Lipinski. Sementara itu, senyawa kuersitrin dan rutin memiliki ikatan hidrogen donor lebih dari 5 dan ikatan hidrogen akseptor lebih dari 10 yang dapat diinterpretasikan senyawa tersebut membutuhkan energi semakin tinggi untuk melakukan proses absorpsi. Selain itu, kuersitrin juga memiliki berat molekul yang lebih dari 500 Da, sehingga senyawa tersebut akan sulit menembus membran sel. Satu hal yang menjadi catatan ialah senyawa kuersitrin dan rutin merupakan flavonoid glikosida, yang berarti senyawa aglikonnya (kuersetin) berikatan dengan gugus gula rhamnosa (kuersitrin) (Barber dan Chang, 1968) dan rutinosa (rutin) (Kreft *dkk.*, 1999). Oleh karena adanya proses hidrolisis dalam tubuh manusia, sehingga masih terdapat toleransi dalam pemanfaatan kedua senyawa tersebut untuk dikembangkan sebagai sediaan oral. Selain itu, kaidah Lipinski pada awalnya digunakan untuk mengevaluasi senyawa sintesis yang akan diskriminasi aktivitas farmakologisnya (Zhang and Wilkinson, 2007), sehingga akan ada beberapa pengecualian untuk senyawa bahan alam karena ada pengaruh biosintesis yang lebih kompleks.

Tabel 1. Hasil Prediksi Sifat Fisikokimia dari Senyawa Bioaktif pada Daun Jambu Biji Berdasarkan Kaidah Lipinski

Nama Senyawa	Berat Molekul (< 500 Da)	Log P (<5)	Ikatan Hidrogen		Pelanggaran	Keterangan
			Donor (<5)	Akseptor (< 10)		
Kuersetin	302,23	1,99	5	7	1	Memenuhi
Kaempferol	286,24	2,28	4	6	0	Memenuhi
Katekin	290,27	1,55	5	6	1	Memenuhi
Kuersitrin	448,38	0,49	7	11	2	Tidak memenuhi
Rutin	610,52	-1,69	10	16	3	Tidak memenuhi
Luteolin	286,24	2,28	4	6	0	Memenuhi
Epikatekin	290,27	1,55	5	6	1	Memenuhi
Asam kafeat	180,16	1,19	3	4	0	Memenuhi
Asam klorogenat	354,31	-0,65	6	9	1	Memenuhi
Asam galat	170,12	0,50	4	5	0	Memenuhi
Asam ferulat	194,18	1,49	2	4	0	Memenuhi

Selanjutnya, sebelas senyawa aktif daun jambu biji diprediksi sifat fisikokimianya untuk mendapatkan informasi mengenai absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitasnya (Tabel 2). Informasi ini digunakan untuk memastikan keamanan dan efektivitas senyawa sebagai obat secara *in silico* (Ferreira dan Andricopoulo, 2019). Parameter yang dilihat untuk absorpsi adalah %HIA (*human intestinal absorption*) dan CaCo-2. %HIA dapat dikategorikan baik apabila memiliki nilai antara 70% hingga 100%, dan sedang apabila memiliki nilai antara 20% hingga 70%. Apabila nilai %HIA kurang dari 20%, maka dikategorikan buruk. Semakin tinggi nilai %HIA, maka semakin mudah senyawa untuk terabsorpsi. Seluruh senyawa uji dikategorikan baik dan sedang berdasarkan %HIA kecuali rutin dengan nilai %HIA kurang dari 20%. Sementara itu, permeabilitas CaCo-2 dapat dikategorikan tinggi apabila memiliki nilai lebih dari 70 nm/sec, sedang apabila memiliki nilai antara 4 nm/sec hingga 70 nm/sec, dan rendah apabila nilai kurang dari 4 nm/sec. Semakin tinggi nilai permeabilitas CaCo-2, maka semakin baik permeabilitas selnya. Dari seluruh senyawa uji, kuersetin, katekin, dan epikatekin masuk dalam kategori rendah untuk parameter CaCo-2 dengan nilai kurang dari 4 nm/sec.

Pada aspek distribusi, parameter yang dilihat adalah PPB dan penetrasi BBB. Suatu senyawa memiliki ikatan kimia terhadap protein plasma yang kuat apabila nilai PPB lebih dari 90% dan lemah apabila nilai PPB kurang dari 90%. Sebanyak 4 dari 11 senyawa uji (kuersetin, katekin, luteolin, epikatekin) memiliki nilai PPB lebih dari 90% mengindikasikan senyawa tersebut memiliki ikatan kimia yang kuat terhadap protein plasma sehingga sulit untuk melintasi membran sel. Pada parameter BBB, semakin tinggi nilainya maka semakin mudah bagi senyawa untuk terabsorpsi ke dalam sistem saraf pusat. Nilai BBB lebih dari 2 menunjukkan absorpsi tinggi ke sistem saraf pusat, nilai antara 2 hingga 0,1 menunjukkan absorpsi sedang, dan nilai kurang dari 0,1 menunjukkan absorpsi yang rendah ke sistem saraf pusat. Seluruh senyawa memiliki nilai BBB sedang, namun mendekati 0,1 sehingga tidak terlalu mudah untuk terabsorpsi ke dalam sistem saraf pusat. Hasil ini menunjukkan bahwa seluruh senyawa masih berpotensi menjadi obat untuk hipertensi karena obat hipertensi tidak ditujukan untuk menembus sawar darah otak menuju sistem saraf pusat.

Untuk melihat toksisitas senyawa, dilihat parameter berupa mutagen dan karsinogen dari senyawa. Mutagen menunjukkan apakah senyawa akan menyebabkan mutasi pada sel atau tidak saat dikonsumsi, sedangkan karsinogen menunjukkan apakah senyawa bersifat karsinogenik atau tidak. Berdasarkan data pada Tabel 2, hanya kuersitrin dan rutin yang bersifat non-mutagen, dan hanya katekin, kuersitrin, dan epikatekin yang tidak menunjukkan potensi karsinogen pada mencit dan tikus, sedangkan senyawa lain memiliki hasil yang bervariasi.

Tabel 2. Hasil Prediksi Profil ADMET dari Senyawa Bioaktif pada Daun Jambu Biji

Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksitas	
	HIA (%)	CaCo-2 (nm/sec)	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
Kuersetin	63,485	3,412	93,236	0,173	Mutagen	Mencit (-) Tikus (+)
Kaempferol	79,439	9,577	89,608	0,286	Mutagen	Mencit (-) Tikus (+)
Katekin	66,708	0,657	100,000	0,395	Mutagen	Mencit (-) Tikus (-)
Kuersitrin	24,947	7,372	64,953	0,037	Non-mutagen	Mencit (-) Tikus (-)
Rutin	2,861	7,913	43,898	0,029	Non-mutagen	Mencit (+) Tikus (-)
Luteolin	79,427	4,539	99,717	0,368	Mutagen	Mencit (+) Tikus (+)
Epikatekin	66,708	0,656	100,000	0,395	Mutagen	Mencit (-) Tikus (-)
Asam kafeat	82,301	21,108	40,291	0,498	Mutagen	Mencit (-) Tikus (+)
Asam klorogenat	20,428	18,717	41,962	0,034	Mutagen	Mencit (+) Tikus (-)
Asam galat	53,696	13,849	65,384	0,348	Mutagen	Mencit (-) Tikus (+)
Asam ferulat	90,603	21,118	50,414	0,758	Mutagen	Mencit (-) Tikus (+)

Selanjutnya, penapisan farmakofor dilakukan untuk mengetahui interaksi antara ligan uji dengan reseptor target. Metode skrining farmakofor virtual dapat divalidasi melalui nilai akurasi diskriminasi dari senyawa aktif dan *decoy*. Semakin banyak senyawa aktif dan semakin sedikit *decoy* yang teridentifikasi, maka semakin baik model farmakofor. Dari proses validasi farmakofor berdasarkan kurva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), model 1 memiliki nilai akurasi yang paling baik (AUC 100%) sebesar 0,85 sehingga digunakan untuk melakukan skrining terhadap senyawa uji (Tabel 3). Setelah dilakukan skrining senyawa uji, didapatkan satu senyawa yang mengalami *hit* dengan model 1, yaitu asam klorogenat dengan *pharmacophore fit score* sebesar 55,99. *Pharmacophore fit score* adalah persentase ukuran kemiripan geometrik suatu farmakofor dibandingkan dengan model 3D aktif ligan farmakofor, yang bermakna semakin tinggi *pharmacophore fit score* menunjukkan bahwa semakin cocok suatu farmakofor terhadap molekul reseptornya (Muchtaridi dkk., 2017).

Tabel 3. Hasil Validasi Skrining Farmakofor Senyawa Bioaktif dari Daun Jambu Biji

Model Farmakofor	Hits	True Positive	False Positive	AUC 100%
1	382	98	284	0,85
2	377	98	279	0,83
3	373	98	275	0,83
4	383	98	285	0,84
5	381	98	283	0,82
6	387	98	389	0,82
7	379	98	381	0,84
8	376	98	278	0,82
9	379	98	281	0,83
10	377	98	279	0,82

Molecular docking atau penambatan molekuler merupakan suatu metode komputasi yang digunakan untuk memprediksi interaksi berupa konformasi ikatan, yaitu posisi dan jenis ikatan serta afinitas ikatan berdasarkan energi ikatan antara suatu molekul kecil (ligan) dengan suatu makromolekul (reseptor). Prediksi ini penting dilakukan dalam pengembangan obat dari senyawa-senyawa yang diperkirakan memiliki aktivitas biologis (Pinzi dan Rastelli, 2019). Preparasi reseptor dan ligan dibutuhkan untuk validasi metode penambatan molekuler melalui *re-docking*. Dalam tahap ini, ditentukan ukuran grid box dan koordinat grid box dengan tujuan memposisikan ligan berada pada kantung aktif reseptor ACE untuk mengetahui posisi aktivitas ligan alami. Posisi *grid box* dengan X=40; Y=40; dan Z=40 dan koordinat *grid box* X=40,935; Y=32,383; dan Z=47,286 dengan unit 0.375 Å merupakan posisi dari sisi aktif ligan alami (lisinopril) berikatan dengan reseptor ACE. Dari hasil validasi, didapatkan RMSD (*root mean square deviation*) sebesar 1,32. Metode penambatan molekuler dikatakan valid jika nilai RMSD yang didapatkan ≤ 2 Å (Muttaqin, dkk., 2019). Nilai RMSD merepresentasikan nilai penyimpangan posisi ikatan ligan alami dengan reseptor sebelum dan sesudah penambatan. Semakin kecil nilai RMSD maka semakin kecil penyimpangan kesalahan dalam proses penambatan. Posisi *grid box* yang sudah diperoleh digunakan pada simulasi penambatan molekuler terhadap senyawa uji dari daun jambu biji.

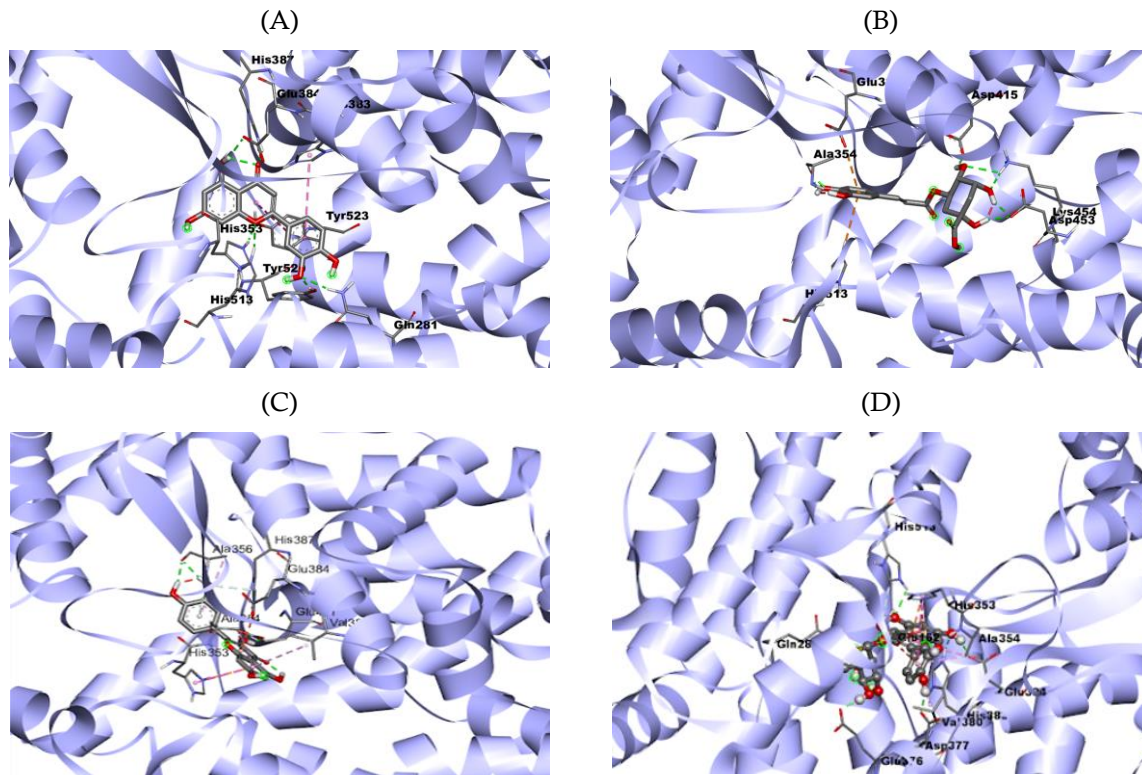
Selanjutnya penambatan molekuler dilakukan pada senyawa uji sebagai ligan terhadap reseptor ACE untuk memprediksi ikatan antara ligan dengan sisi aktif reseptor. Berdasarkan hasil simulasi, seluruh senyawa memiliki nilai energi ikatan (ΔG) negatif yang menandakan bahwa senyawa memiliki afinitas ikatan yang besar terhadap reseptor target. Selain itu, hampir seluruh senyawa, kecuali asam galat dan rutin memiliki konstanta inhibisi yang lebih kecil daripada ligan alami berupa Lisinopril yang juga berperan sebagai senyawa pembanding ($\Delta G = -10,08$ kkal/mol; KI = 41,14 μM) (Tabel 4). Meskipun rutin memiliki energi ikatan yang paling kecil diantara senyawa uji lainnya, namun rutin memiliki konstanta inhibisi yang lebih besar daripada senyawa pembanding berupa lisinopril, yang menunjukkan bahwa untuk menghambat reseptor target diperlukan konsentrasi senyawa uji yang lebih banyak daripada senyawa pembanding. Selain rutin, 2 senyawa uji lain yang memiliki energi ikatan terkecil adalah kuersitrin dan luteolin. Kuersitrin memiliki energi ikatan sebesar -7,77 kkal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 2,01 μM . Energi ikatan yang dimiliki kuersitrin masih lebih besar dibandingkan energi ikatan senyawa pembanding lisinopril, namun konstanta inhibisinya jauh lebih kecil daripada lisinopril. Jika dibandingkan dengan luteolin dengan energi ikatan sebesar -7,59 kkal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 2,73 μM , energi ikatan dan konstanta inhibisi kuersitrin tetap lebih kecil. Senyawa asam klorogenat yang menjadi senyawa *hit* berdasarkan analisis farmakofor juga menunjukkan besaran energi ikatan bebas yang tidak jauh berbeda, yakni sebesar -7,09 kkal/mol. Berbagai interaksi dapat terjadi antara reseptor target dan senyawa uji dalam bentuk ikatan, misalnya ikatan hidrogen, ikatan van der Waals, serta ikatan lainnya seperti pi-alkyl dan pi-sigma. Berdasarkan penelitian Irsa, dkk., (2022), ikatan penting antara senyawa uji dan reseptor target untuk menghambat reseptor ACE adalah HIS383, HIS387, GLU411, dan GLU384. Sebagian besar senyawa uji yang dianalisis memiliki interaksi pada residu asam amino tersebut, seperti ikatan hidrogen pada HIS383 oleh senyawa kaempferol, rutin, luteolin dan asam ferulat; HIS387 oleh senyawa kuersetin dan asam ferulat; GLU411 oleh asam ferulat; dan GLU384 oleh senyawa kuersetin dan asam klorogenat (Gambar 2A-D).

Tabel 4. Hasil Penambatan Molekul dari Senyawa Bioaktif Daun Jambu Biji pada Reseptor ACE

Nama Senyawa	Binding Energy (kkal/mol)	KI (μM)	Interaksi dengan Asam Amino		
			Ikatan Hidrogen	Ikatan van der Waals	Lain-Lain
Lisinopril (Senyawa Pembanding)	-10,08	41,14	GLN A : 281	-	HIS A : 513
					HIS A : 353
					ASP A : 377
					GLU A : 162
					LYS A : 511
					GLU A : 384
					GLU A : 376
					ALA A : 354
					VAL A : 380

					HIS A : 387 ALA A : 356
Kuersetin	-6,59	14,85	GLU A : 411 ALA A : 356	-	HIS A : 353 HIS A : 384 VAL A : 380 ALA A : 354
Kaempferol	-6,62	13,95	GLU A : 411 GLU A : 376 GLU A : 162 ALA A : 354 TYR A : 523	-	HIS A : 383 ASP A : 377 HIS A : 353 VAL A : 380 VAL A : 380 ALA A : 354
Katekin	-6,84	9,76	ASP A : 377 CYS A : 370 GLU A : 162 LYS A : 511	-	ALA A : 354 HIS A : 513 HIS A : 353 VAL A : 380
Kuersitrin	-7,77	2,01	GLU A : 376 GLU A : 162 GLU A : 384 HIS A : 513 HIS A : 383 ASP A : 377 GLN A : 281	-	HIS A : 513 HIS A : 353 HIS A : 353 ALA A : 354
Rutin	-9,46	115,97	GLU A : 376 GLU A : 411 HIS A : 353 ALA A : 354 ASP A : 377	-	HIS A : 383 ALA A : 354 GLN A : 369 GLU A : 162 HIS A : 353 TRP A : 279 ALA A : 354

			HIS A : 353		
			HIS A : 513		HIA A : 383
Luteolin	-7,59	2,73	HIS A : 387	-	TYR A : 523
			GLN A : 281		
			GLU A : 384		
			TYR A : 520		
			TYR A : 523		HIS A : 353
			ALA A : 354		GLU A : 162
Epikatekin	-7,53	3,01	GLN A : 281	-	TYR A : 523
			GLU A : 162		VAL A : 380
			LYS A : 511		HIS A : 353
					ALA A : 354
			LYS A : 511		HIS A : 513
Asam kafeat	-7,17	5,53	GLN A : 281	-	PHE A : 527
			ASP A : 453		
			LYS A : 454		
			ALA A : 354		GLU A : 384
Asam klorogenat	-7,09	6,39	ASP A : 415	-	HIS A : 513
			ASP A : 453		
			LYS A : 454		
			LYS A : 511		
Asam galat	-4,38	613,79	HIS A : 353	-	-
			TYR A : 523		
			GLU A : 411		
			GLN A : 281		GLU A : 411
			LYS A : 511		HIS A : 513
Asam ferulat	-6,69	12,53	HIS A : 383	-	TYR A : 523
			GLU A : 384		HIS A : 383
					HIS A : 387



Gambar 2. Visualisasi interaksi antara (A) Luteolin, (B) Asam Klorogenat, (C) Kuersetin, dan (D) Kuersitrin dengan reseptor ACE

Berdasarkan hasil penambatan molekul pada Tabel 4., kuersitrin sangat berpotensi menjadi *inhibitor* reseptor ACE, namun kuersitrin tidak memenuhi prinsip Lipinski karena melebihi ketentuan ikatan hidrogen, sehingga tidak dapat dijadikan sebagai kandidat obat oral. Walaupun secara struktur, kuersitrin merupakan senyawa flavonol glikosida dari kuersetin yang berkonjugasi dengan gugus gula rhamnose (Ye and Ge, 2014) yang akan terhidrolisis dalam tubuh sebelum berinteraksi secara molekuler dengan protein. Lebih lanjut, satu-satunya senyawa yang memberikan *hit* pada reseptor ACE dari 11 senyawa uji pada penapisan farmakofor adalah asam klorogenat. Adanya *hit* terhadap reseptor target menunjukkan bahwa senyawa memiliki potensi untuk berikatan dengan reseptor target. Asam klorogenat diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang berpengaruh secara tidak langsung dalam proses penurunan tekanan darah (Suzuki *dkk.*, 2006), serta memiliki interaksi pada RAAS berdasarkan hasil uji *in vitro* (Actis-Goretta *dkk.*, 2006) dan *in vivo* (Ardiansyah *dkk.*, 2008). Penelitian eksperimental lainnya menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu mampu memodulasi ACE1 pada tikus hipertensi yang diinduksi oleh siklosporin (Babatola dan Oboh, 2021). Efek tersebut kemungkinan salah satunya berasal dari aktivitas dari berbagai komponen senyawa metabolit sekunder yang ada pada daun jambu biji, seperti asam klorogenat, luteolin, dan kuersetin dalam menjaga tekanan darah.

Hasil yang didapatkan dari hasil skrining farmakofor dan penambatan molekul masih menunjukkan sedikit perbedaan. Ini diakibatkan oleh perbedaan parameter serta prinsip dari kedua jenis uji tersebut, seperti skrining farmakofor berfokus pada pencarian gugus farmakofor pada target reseptor yang esensial tanpa melihat bagaimana interaksinya dengan reseptor dapat terjadi. Sedangkan pada uji penambatan molekuler, fleksibilitas protein target diminimalisasi, sehingga tidak dapat melihat potensi sisi aktif protein dengan ligan yang *overlapping* selama analisis berlangsung. Lebih lanjut, penelitian ini juga masih memiliki keterbatasan karena hanya berupa studi komputasi sehingga diperlukan konfirmasi melalui penelitian eksperimental lebih lanjut terhadap senyawa-senyawa dalam daun jambu biji yang dianggap berpotensi sebagai untuk terapi hipertensi tertarget pada ACE. Penggunaan daun jambu biji sebagai pengobatan herbal pada masyarakat sering diterapkan karena proses ekstraksinya yang mudah, yaitu dengan direbus menggunakan air dan diminum air hasil rebusannya, dan dengan adanya penelitian lanjutan, diharapkan potensi senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji untuk menjaga tekanan darah dapat diverifikasi sehingga masyarakat dapat mengkonsumsi daun jambu biji sebagai terapi pendamping bagi pasien hipertensi.

Simpulan

Berdasarkan hasil evaluasi sifat fisikokimia berdasarkan kaidah Lipinski, prediksi profil ADMET, dan penambatan molekul terhadap 11 senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji, didapatkan bahwa beberapa senyawa berpotensi tertarget pada reseptor ACE, seperti luteolin dan asam klorogenat. Luteolin berpotensi karena memiliki energi ikatan dan konstanta inhibisi yang kecil, serta memiliki banyak ikatan penting yang berperan dalam menginhibisi reseptor ACE, dan asam klorogenat berpotensi karena merupakan satu-satunya senyawa yang memberikan *hit* pada reseptor.

Daftar Referensi

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., & Fraga, C. G. 2006. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1): 229–234.
- Ardiansyah, Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Koseki, T., & Komai, M. 2008. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8): 2825–2830.
- Babatola, L.J. and Oboh, G., 2021. Extract of varieties of guava (*Psidium guajava* L.) leaf modulate angiotensin-1-converting enzyme gene expression in cyclosporine-induced hypertensive rats. *Phytotherapy Plus*, 1(4), p.100045.
- Barber, G.A. and Chang, M.T.Y., 1968. The enzymic glycosylation of quercetin to quercitrin. *Phytochemistry*, 7(1), pp.35-39.
- Braga, D.C.A., Gomes, P.M., Batista, M.A.C., de Souza, J.A., Bastos, J.C.S.A., Rodrigues-das-Dôres, R.G., Alzamora, A.C., de Souza, G.H.B., de Moura, S.A.L., Talvani, A., Antunes, V.R., dan Cardoso, L.M. 2022. Effects of *Psidium guajava* L. leaves extract on blood pressure control and IL-10 production in salt-dependent hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155(2022): 1–11.
- Destra, E., Frisca, F., Santoso, A.H., dan Firmansyah, Y. 2022. Hubungan Asupan Makanan Cepat Saji dengan Angka Kejadian Hipertensi pada Orang Dewasa dengan Aktifitas Fisik Ringan Hingga Sedang. *Jurnal Medika Hutama*, 3(3): 2525–2529.
- Gielen, S., de Backer, G., Piepoli, M.F., dan Wood, D. 2015. *The ESC Textbook of Preventive Cardiology*. United Kingdom: Oxford University Press.
- Kreft, S., Knapp, M. and Kreft, I., 1999. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(11), pp.4649-4652.
- Ironi, E.A., Agboola, S.O., Oboh, G., Boligon, A.A., Athayde, M.L., dan Shode, F.O. 2016. Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension *in vitro*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(2): 122–130.
- Irsa, R.A.P., Seno, D.S.H., Safithri, M. & Kurniasih, R. 2022. Penapisan *Virtual* Senyawa Aktif Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme*. *Jurnal Farmamedika*, 7(2): 104–113.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2021. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor Hk.01.07/Menkes/4634/2021 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tatalaksana Hipertensi Dewasa*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Laurensia, L., Destra, E., Saint, H.O., Syihab, M.A.Q., & Ernawati, E. 2022. Program Intervensi Pencegahan Peningkatan Kasus Hipertensi di Wilayah Kerja Puskesmas Sindang Jaya. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 2(2): 1227–1232.
- Lee, S. K., Lee, I. H., Kim, H. J., Chang, G. S., Chung, J. E., & No, K. T. 2003. The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, 2003: 418–420.
- Lipinski, C. A. 2004. Lead- and Drug-Like Compounds: The Rule-Of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4): 337–341.
- Muchtaridi M, Syahidah HN, Subarnas A, Yusuf M, Bryant SD, Langer T. Molecular docking and 3D-pharmacophore modeling to study the interactions of chalcone derivatives with estrogen receptor alpha. *Pharmaceuticals*. 2017;10(4):1-12.

- Muttaqin, F.Z., Ismail, H., Muhammad, H.N. 2019. Studi Molecular Docking, Molecular Dynamic, dan Prediksi Toksisitas Senyawa Turunan Alkaloid Naftiridin sebagai Inhibitor Protein Kasein Kinase 2- pada Kanker Leukimia. *Pharmacoscript*, 2(1): 49-64.
- Nafrialdi. 2007. *Antihipertensi*. Jakarta: Gaya Baru.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. 2019. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18): 4331.
- Schmieder, R. E. 2005. Mechanisms for the Clinical Benefits of Angiotensin II Receptor Blockers. *American Journal of Hypertension*, 18(5): 720-730.
- Solekha, R., Puspaningsih, N.N.T., Setiyowati, P.A.I., Kusumanegara, S.B.S.M., Mujahid, F., dan Purnobasuki, H. 2023. The Effect in Vivo and in Silico Citronella Grass Extract (*Cymbopogon nardus* L.) on the Plasma ACE Inhibitory activity and Antihypertensive effect. *Research J. Pharm. and Tech.*, 16(10): 4487.
- Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., & Saito, I. 2006. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 24(6): 1065–1073.
- Tilaqza, A. dan Herbani, M. 2021. Studi In silico Potensi Anti Hipertensi dan Prediksi Profil Farmakokinetika Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia*. Lamk). *Jurnal Kesehatan Islam*, 10(2): 45–52.
- Wulandari, A., Sari, S. A., dan Ludiana. 2023. Penerapan Relaksasi Benson Terhadap Tekanan Darah Pada Pasien Hipertensi Di RSUD Jendral Ahmad Yani Kota Metro Tahun 2022. *Jurnal Cendikia Muda*, 3(2): 163-171.
- Ye, L., Guo, J., & Ge, R. S. (2014). Environmental pollutants and hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitamins and hormones*, 94, 349–390.
- Zhang, M.Q. and Wilkinson, B., 2007. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current opinion in biotechnology*, 18(6), pp.478-488.