



In Silico Test of Active Compounds of Pomegranate Fruit (*Punica granatum L*) Against Estrogen Receptor- α for Osteoporosis

Spica Diani Anandawijaya✉, Nurul Latifah, Ifa Latifah, Primadini Ayesha Nugraha, Rizky Prasiska Wulandari, Halwa Aulia Nurdin, dan *Rina Fajri Nuwarda

Departemen 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 : 11-02-2025

Dipublikasikan : 05-05-2025

Keywords:

Punica granatum
Estrogen alpha
Molecular Docking
Osteoporosis

Abstrak

Osteoporosis merupakan penyakit tulang sistemik yang ditandai dengan menurunnya kepadatan tulang, sehingga tulang mudah patah. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas kandungan senyawa fitoestrogen pada buah delima (*Punica granatum L*) terhadap estrogen alpha secara In Silico. Penelitian ini bertujuan agar didapatkan kandidat obat baru untuk terapi osteoporosis. Metode yang digunakan ialah dengan melakukan docking ulang terhadap ligan alami raloxifene dan docking terhadap ligan senyawa uji yang merupakan senyawa metabolit sekunder pada buah delima. Gridbox yang digunakan memiliki koordinat x center : -2.079; y center : -30.746; z center : 22.813. Senyawa uji caffeic acid memiliki potensi terbaik berikatan dengan reseptor estrogen alpha.

Abstract

Osteoporosis is a systemic bone disease characterized by decreased bone density, so bone breaks easily. In this study, the activity of the phytoestrogen compound content in pomegranates (*Punica granatum L*) against estrogen alpha in Silico. The study aims to get new drug candidates for osteoporosis therapy. The method used is to dock the re-docking of the natural ligands of raloxifene and docking against the ligands of test compounds which are secondary metabolite compounds in pomegranates. The Gridbox used has coordinates x center : -2,079; y center : -30,746; z center : 22,813. The caffeic acid test compound has the best potential binding to the alpha estrogen receptor.

✉ Alamat korespondensi:

Jalan Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor, Jawa Barat 45363
E-mail: spica22001@mail.unpad.ac.id

Pendahuluan

Osteoporosis merupakan penyakit tulang sistemik yang ditandai dengan menurunnya kepadatan tulang sehingga membuat tulang menjadi rapuh sehingga meningkatkan risiko terjadinya patah tulang. Faktor risiko osteoporosis adalah usia, dengan risiko meningkat 1,4 hingga 1,8 kali lipat setiap 10 tahun. Secara genetik, orang Kaukasia dan Eropa Timur mempunyai risiko lebih tinggi terkena osteoporosis dibandingkan orang kulit hitam dan Polinesia. Osteoporosis juga lebih sering terjadi pada wanita dibandingkan pria. Faktor lingkungan antara lain kekurangan kalsium, kurang aktivitas fisik, merokok, alkohol, obat-obatan (kortikosteroid, antikonvulsan, heparin, siklosporin), dan peningkatan risiko jatuh (gangguan penglihatan, gangguan keseimbangan) (Wicaksono dan Maulana, 2020). Perempuan diketahui lebih umum mengalami osteoporosis dibandingkan laki-laki. Hal tersebut didukung dengan data prevalensi osteoporosis yang meningkat seiring dengan meningkatnya populasi penduduk lanjut usia. Di Indonesia, prevalensi osteoporosis pada perempuan usia 50-70 tahun sebesar 23% dan pada usia >70 tahun sebesar 53%. Pada fase plateau kepadatan tulang akan menurun perlahan seiring dengan usia (Kemenkes; 2023). Penurunan kepadatan tulang dapat terjadi dari proses penuaan dan menopause. Pada wanita menopause, defisiensi estrogen yang menyebabkan ketidakstabilan antara pembentukan tulang dan penyerapan tulang sehingga berdampak negatif pada pembentukan tulang, menurunkan massa tulang, dan meningkatkan risiko patah tulang (Pambella, 2019).

Raloxifene adalah modulator reseptor estrogen selektif (SERM) dengan efek agonis estrogen. Raloxifene efektif dalam mencegah osteoporosis pada wanita pascamenopause dengan menghambat resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan tulang (Hartiningih dan Anggraeni, 2016). Akan tetapi, obat tersebut memiliki efek samping seperti meningkatkan risiko kanker uterus, sakit kepala, nyeri sendi, dan perubahan mood (Pambella, 2019).

Terapi penggantian hormon merupakan pengobatan alternatif yang efektif untuk wanita menopause. Namun berdasarkan studi klinis, diketahui bahwa penerapan terapi penggantian hormon meningkatkan risiko kanker payudara, endometrium dan ovarium. Oleh karena itu, fitoestrogen merupakan alternatif yang potensial dan relatif aman untuk terapi penggantian hormon. Salah satu terapi alternatif yang banyak dikembangkan adalah fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa estrogenik yang berasal dari tumbuhan, salah satu fitoestrogen yang banyak diteliti adalah golongan flavonoid. Karena senyawa flavonoid secara struktural mirip dengan estrogen, maka senyawa tersebut dapat berikatan dengan sel target dan mengaktifkan reseptor estrogen. Beberapa fitoestrogen ditemukan berikatan dengan reseptor estrogen (ER β dan ER α) dan dapat memberikan efek mirip estrogen. Beberapa fitoestrogen telah menunjukkan efek positif pada struktur dan fisiologi vagina baik pada model hewan maupun uji klinis pada wanita pascamenopause (Rusnaldi dan Shalahuddin, 2022). Buah delima (*Punica granatum L*) diketahui mengandung fitoestrogen alami yang dapat digunakan untuk mengatasi osteoporosis pascamenopause. Delima mengandung asam caffeic, katekin, asam klorogenat, asam p-kumarat, asam ellagic, etil brevifolia, asam ferulat, asam galat, pedunculagin, dan quercetin. Asam ellagic, salah satu fitoestrogen dalam buah delima, telah dipelajari untuk bertindak sebagai modulator reseptor estrogen selektif (SERM) yang bekerja pada subtipe reseptor estrogen ER- α dan ER- β . Asam ellagic mempengaruhi aktivitas subtipe reseptor estrogen ER- α (estrogen) dan ER- β (antiestrogen) (Handayani, *et al.*; 2017; Kemenkes; 2023).

Estrogen- α (ER- α) dikaitkan dengan stimulasi estrogen pada ekspresi gen dan proliferasi sel. ER- α berperan penting dalam perkembangan kanker payudara. Hormon estrogen juga menghambat reabsorpsi kalsium di tulang, bekerja pada ginjal untuk menyerap kembali kalsium di tubulus ginjal, dan kemudian di duodenum. Penurunan hormon estrogen meningkatkan reabsorpsi kalsium dan fosfor pada tulang (Handayani, *et al.*; 2017; Kemenkes; 2023).

Metode *in silico* adalah pendekatan yang menggunakan simulasi komputer dengan menggunakan program khusus untuk mengidentifikasi senyawa dengan potensi dan selektivitas lebih tinggi (Wang, *et al.*; 2015). Metode komputasi (*in silico*) telah dikembangkan dan diterapkan untuk pengembangan dan pengujian hipotesis farmakologis. Metode *in silico* ini mencakup database, hubungan struktur-aktivitas kuantitatif, farmakofor, model homologi dan pendekatan pemodelan molekuler lainnya, pembelajaran mesin, penambahan data, alat analisis jaringan, dan alat analisis data komputasi. Metode *in silico* terutama digunakan bersama dengan pembuatan data *in vitro* untuk membangun dan menguji model. Model seperti ini banyak digunakan untuk penemuan dan optimalisasi molekul baru yang memiliki afinitas terhadap molekul target, penjelasan sifat penyerapan, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas, serta karakterisasi fisikokimia (Nusantoro dkk., 2020).

Lipinski's Rules Of Five merupakan aturan praktis untuk mengevaluasi kemiripan obat, atau menentukan apakah suatu senyawa kimia dengan aktivitas farmakologis atau biologis tertentu memiliki sifat yang menjadikannya obat yang kemungkinan aktif secara oral pada manusia berdasarkan pengamatan bahwa sebagian besar obat memiliki molekul yang relatif kecil dan lipofilik. Aturan tersebut mengusulkan bahwa molekul harus mematuhi beberapa komponen diantaranya berikut: 1) tidak lebih dari lima donor

ikatan hidrogen 2) tidak lebih dari sepuluh akseptor ikatan hidrogen karena tingginya jumlah ikatan hidrogen dapat mengurangi partisi molekul dari fase larut air ke dalam membran bilayer lipid untuk permeasi dengan difusi pasif 3) kurang dari 500 Dalton massa molekul karena massa molekul tinggi mengurangi konsentrasi senyawa pada permukaan epitel usus yang mengurangi penyerapan 4) tidak lebih dari 5 log P (koefisien partisi oktanol-air), karena nilai log P tinggi dapat menyebabkan penyerapan yang buruk (Nusantoro dkk., 2020). Lipinski's Rules Of Five dilakukan untuk mengetahui sifat fisikokimia senyawa obat untuk kemudian mengetahui bioavailabilitas suatu sediaan obat oral (Camp Garavelas & Campitelli, 2015).

Prediksi ADMETOKS merupakan prediksi yang dapat memberikan informasi tentang bioavailabilitas oral, permeabilitas sel, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas, yaitu sifat farmakokinetik dan farmakodinamik suatu molekul obat. Evaluasi kandidat obat biasanya dilakukan melalui analisis profil kesamaan dan penyerapan obat, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADMET). Prediksi profil ADMET menunjukkan berbagai profil penyerapan, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas, termasuk penyerapan usus manusia (Human Intensive Absorpsi/HIA), distribusi sawar darah-otak (BBB), dan pengikatan protein plasma (Plasma Protein Binding). Parameter penghambatan dan profil karsinogenisitas. Nilai serapan menunjukkan serapan yang baik di tubuh manusia dan serapan yang baik di usus (Nusantoro dkk., 2020). Pendistribusian yang tepat memerlukan keterampilan distribusi BBB dan PPB yang baik. Parameter BBB adalah kemampuan pembuluh darah untuk melakukan vaskularisasi pada sistem saraf pusat (SSP), sehingga secara ketat mengontrol pergerakan ion, molekul, dan sel antara darah dan otak. Nilai PPB adalah derajat distribusi pengikatan protein dalam darah, yang memungkinkan tubuh mendistribusikan darah yang terikat pada komponen obat. Semakin besar kapasitas pengikatan protein plasma, semakin baik distribusi bahan aktif dalam darah (Daneman, 2015).

Docking molekuler adalah teknik pemodelan molekuler yang digunakan untuk memprediksi interaksi antara protein (enzim) dan molekul kecil (ligan). Tujuan dari docking ligan-protein adalah untuk memahami dan memprediksi pengenalan molekul, menemukan kemungkinan mode pengikatan, dan memprediksi afinitas pengikatan (Prasetyo *et al.*, 2021).

Metode

Pada prediksi Lipinski Rule of Five (RO5) dan ADME/Tox digunakan situs admetSAR, dan PubChem, dan situs PreADMET. Adapun proses penambatan molekuler dilakukan pada dengan Laptop Asus Vivobook 11th Gen Intel(R) Core(TM) i5-1135G7 @ 2.40GHz 2.42 GHz. Beberapa software turut digunakan dalam penambatan molekuler diantaranya Biovia Discovery Studio, Autodock, dan situs Protein Data Bank (PDB).

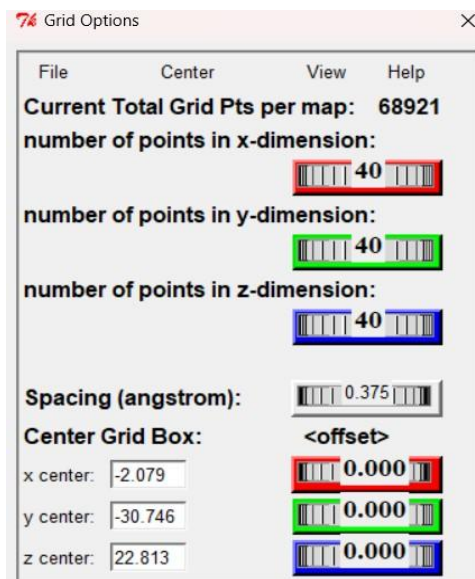
Studi literatur digunakan untuk mengetahui aktivitas dan kandungan metabolit sekunder pada tanaman buah delima serta untuk mengetahui reseptor yang akan disimulasikan secara komputasi dengan ligan-ligan. Prediksi sifat fisikokimia dilakukan berdasarkan aturan Lipinski Rule of Five (RO5) pada metabolit sekunder yaitu asam kafeat, katekin, asam klorogenat, p-kumarat, asam elagat, etil brevifolia, asam ferulat, asam galat, pedunculagin dan kuersetin. Prediksi aturan Lipinski dilakukan menggunakan situs admetSAR kemudian mencari data *computed descriptors* (SMILES) dari metabolit sekunder tanaman buah delima pada website PubChem.

Prediksi ADME/Tox dilakukan pada situs PreADMET. Situs PreADMET memiliki tiga fitur yaitu, prediksi drug likeness, prediksi adme, dan prediksi toksisitas. Analisis ADME dilakukan dengan memasukkan senyawa uji ke dalam situs PreADMET menggunakan fitur prediksi ADME. Prediksi ADME ini akan menghasilkan data nilai HIA (Human Intestinal Absorption), nilai CaCO₂, nilai protein plasma binding (PPB), dan nilai blood brain barrier (BBB). Uji toksisitas senyawa uji dilakukan pada fitur prediksi toksisitas. Prediksi toksisitas akan menghasilkan data sifat mutagen senyawa berdasarkan uji mutagenisitas dan sifat karsinogen berdasarkan uji karsinogenitas pada model mencit dan tikus.

Untuk mengetahui potensi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman buah delima untuk terapi osteoporosis, dilakukan penambatan molekuler. Sebelum dilakukan penambatan molekuler, perlu disiapkan working folder yang berisi autogrid4.exe dan autodock4.exe juga reseptor dan ligan uji dalam format pdbqt yang sudah dibuat sebelumnya. Ligan dan reseptor diperoleh dan diunduh melalui Protein Data Bank (www.rcsb.org) dengan format pdb. Kemudian ligan dan reseptor dipreparasi dengan aplikasi Biovia Discovery Studio dengan menghilangkan molekul air dan memisahkan reseptor dengan ligan alami. Ligan alami yang diperoleh kemudian dipreparasi pada software Autodock dengan menambahkan muatan Gasteiger, penambahan atom hidrogen, penggabungan ligan menjadi non-polar, dan penambahan torsi. Di samping itu, reseptor dipreparasi dengan penambahan muatan Kollman dan penambahan atom hidrogen polar.

Ligan alami dan reseptor yang telah dibuat dalam format pdbqt kemudian dilakukan re-docking. Re-docking dilakukan dengan penentuan grid box yang diatur berdasarkan koordinat ligan alami dengan memilih center on ligand yang dilanjutkan dengan menyimpan dalam bentuk gpf. Adapun parameter

koordinat gridbox yang digunakan terdapat pada **Gambar 1**. Koordinat gridbox yang diperoleh terletak pada x center : -2.079; y center : -30.746; z center : 22.813.



Gambar 1. Grid Box Sisi Aktif Reseptor Estrogen- α dengan Ligan Alami (Raloxifene) pada Aplikasi AutodockTools-1.5.6

Pengaturan parameter docking dilakukan sebagai Genetic Algorithm dan output disimpan dalam Lamarckian GA dengan format dpf. Docking kemudian dilakukan pada command prompt (CMD), dengan perintah pertama berupa `autogrid4 -p dock.gpf -l dock.glg`. Selanjutnya perintah kedua berupa `autodock4 -p dock.dpf -l dock.dlg`. Hasil docking sesuai perintah pada CMD dapat dianalisis dengan software Autodock dan hasil visualisasi dapat dilakukan pada aplikasi Biovia Discovery Studio.

Hasil dan Pembahasan

Reseptor estrogen dapat ditemukan pada sel osteoklas maupun osteoblas. Aktivasi dari reseptor estrogen memerlukan adanya estrogen sebagai ligan. Obat yang beredar di pasaran yang memiliki efek seperti estrogen yaitu golongan Raloxifen, juga dikenal sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERM), adalah jenis obat yang tersedia di pasaran yang memiliki efek seperti estrogen. Diperkirakan bahwa raloxifen bekerja pada tulang melalui interaksi dengan TGF yang diproduksi oleh osteoblas, yang memiliki fungsi untuk menghambat diferensiasi sel osteoklas. Beberapa penelitian menyatakan pemakaian fitoestrogen memberikan hasil yang baik untuk defisiensi estrogen atau untuk mencegah osteoporosis (Rusnaldi & Shalahudin, 2022). Sepuluh senyawa metabolit sekunder tanaman buah delima, yaitu Caffeic Acid, Catechin, Chlorogenic Acid, Ellagic Acid, Etil Brevifolia, Ferulic Acid, Gallic Acid, p-Coumaric Acid, Pedunculagin, dan Quercetin dilakukan prediksi sifat fisikokimia berdasarkan aturan Lipinski Ryle of Five (RO5). Prediksi sifat fisikokimia ini bertujuan untuk mencegah kegagalan dari senyawa ketika senyawa senyawa ini akan dikembangkan menjadi suatu obat.

Tabel 1. Hasil Aturan Lipinski RO5

No	Nama Senyawa	Berat Molekul <500 Da	Log P <5	Ikatan Hidrogen		Lipinski (RO5)
				Donor <5	Akseptor <10	
1	Caffeic Acid	180.15742	1.1956	3	4	Terpenuhi
2	Catechin	290.26806	1.5461	5	6	Terpenuhi
3	Chlorogenic Acid	354.31	-1.05	6	9	Terpenuhi
4	Ellagic Acid	302.19264	1.3128	4	8	Terpenuhi
5	Etil Brevifolia	320.25	0.74	3	8	Terpenuhi
6	Ferulic Acid	194.184	1.4986	2	4	Terpenuhi
7	Gallic Acid	170.11954	0.5016	4	5	Terpenuhi
8	p-Coumaric Acid	164.16	1.5	2	3	Terpenuhi
9	Pedunculagin	784.5	0.9	13	22	Tidak Terpenuhi
10	Quercetin	302.2357	1.988	5	7	Tidak Terpenuhi

Setelah diprediksi sifat fisikokimia dari 10 senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan Lipinski RO5, kemudian ke-10 senyawa tersebut juga diprediksi ADME/Tox-nya, hal ini dilakukan agar dapat mengetahui informasi mengenai bioavailabilitas oral, permease sel, metabolisme, eliminasi, dan toksisitas yang menjadi karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari sebuah molekul obat.

Analisis sifat fisikokimia dan profil farmakokinetik (ADME/Tox) secara *in silico* diperlukan sebagai rujukan awal dalam pengembangan senyawa obat. Hal tersebut karena analisis senyawa secara *in vitro* dan *in vivo* membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang lebih besar. Prediksi sifat fisikokimia, profil farmakokinetik dan toksisitas kandidat obat diperlukan untuk menunjang keberhasilan proses selanjutnya. Pada beberapa pengembangan obat baru, sebagian besar obat yang dievaluasi dalam uji klinis tidak dapat mencapai pasar karena kurang efektif dan adanya efek samping obat yang tidak dapat diterima. Dalam hal ini, aktivitas obat, profil farmakokinetik, dan toksisitas sangat penting agar obat yang dihasilkan dapat berkhasiat, bermutu, dan aman. Melalui identifikasi sifat ADMET kandidat obat baru, maka dapat secara signifikan mengurangi jumlah senyawa yang gagal dalam uji klinis karena sifat-sifat ADMET yang buruk (Pires, Blundell dan Ascher, 2015).

Tabel 2. Hasil Prediksi ADME/Tox

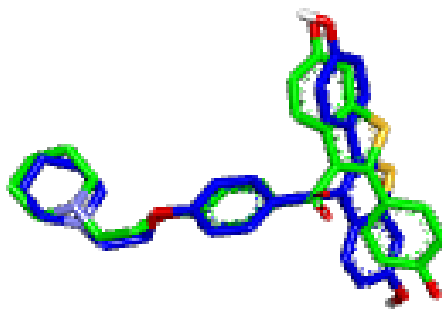
No	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Mutagen	Toksitas	
		HIA	CaCO ₂	PPB	BBB		Karsinogen	
							Rat	Mouse
1	Caffeic Acid	82.301 311	21.107 6	40.290635	0.497 6	Non- mutagen	Negatif	Negatif
2	Catechin	66.707 57	0.6569 62	100.00000 0	0.394 913	Mutagen	Negatif	Negatif
3	Chlorogenic Acid	82.301 311	21.107 6	40.290625	0.497 6	Mutagen	Positif	Negatif
4	Ellagic Acid	61.395 127	20.488 8	88.402085	0.321 339	Mutagen	Positif	Negatif
5	Etil Brevifolia	61.062 567	20.922 9	60.842638	0.017 9146	Mutagen	Negatif	Positif
6	Ferulic Acid	90.60	21.12	50.41	0.758	Mutagen	Positif	Negatif
7	Gallic Acid	53.69	13.849 2	65.3846	0.348	Mutagen	Positif	Negatif
8	p-Coumaric Acid	92.095 876	21.109 3	63.055072	0.694 635	Mutagen	Positif	Positif
9	Pedunculagi n	0.0	16.737	100.00000 0	.0275 691	Non mutagen	Positif	Positif
10	Quercetin	63.48	3.413	93.24	0.173	Mutagen	Positif	Negatif

Langkah selanjutnya, dilakukan penambatan molekul terhadap sepuluh senyawa metabolit sekunder dari buah delima untuk mengetahui interaksi antara ligan senyawa uji dengan reseptor target. Docking dapat mengidentifikasi suatu senyawa baru untuk kepentingan dalam bidang terapeutik, memungkinkan untuk memprediksi interaksi antara protein target dan ligan pada tingkat molekuler, serta menggambarkan hubungan antara struktur-aktivitas. Pemanfaatan studi penambatan molekuler memungkinkan dalam mengurangi biaya dan meningkatkan peluang untuk menemukan kandidat obat baru yang diinginkan, sehingga penemuan obat baru dapat dilakukan lebih efisien (Pinzi et al, 2019). Estrogen- α sebagai reseptor target, dengan kode reseptor 7KBS membentuk kompleks dengan Raloxifene sebagai ligan alami dan merupakan reseptor manusia (*Homo sapiens*) Struktur reseptor diperoleh dengan metode kristalografi (difraksi sinar X). Metode kristalografi baik untuk diaplikasikan pada struktur molekul yang besar dan memberikan hasil yang lebih presisi. Adapun hasil kristalografi yang baik dapat dinilai berdasarkan nilai resolusinya. Semakin kecil nilai resolusinya, maka semakin baik struktur yang diperoleh. Diketahui, reseptor estrogen- α dengan kode 7KBS memiliki nilai resolusi 1.83 Å. Diketahui bahwa resolusi 1.5-2 Å dikategorikan sebagai *high resolution* (Dubach dan Guskov, 2020).

Pada tahapan preparasi reseptor target, penghilangan molekul air dan ligan alami dilakukan agar tidak mengganggu proses penambatan molekuler. Molekul air diketahui dapat memediasi interaksi antara reseptor dan ligan sehingga hasil docking yang diperoleh kurang baik, dimana terdapat kompleksitas perhitungan matematika yang menyebabkan waktu docking menjadi lebih lama (Hasan et al., 2022). Selain itu, penambahan muatan parsial Kollman dan penambahan ikatan hidrogen pada bagian polar dengan aplikasi Autodock didasarkan pada interaksi antara ligan dan reseptor yang umumnya terjadi melalui ikatan hidrogen dan disesuaikan dengan pH dalam tubuh (Hazar, et al., 2020).

Preparasi ligan uji mencakup langkah berupa optimasi geometri ligan uji yang bertujuan untuk menghasilkan energi terendah ligan yang menunjukkan kestabilan struktur yang diperoleh ligan uji (Pratama, *et al.*, 2021). Penambahan muatan gasteiger pada ligan uji tujuannya adalah untuk menyesuaikan keadaan lingkungan saat dilakukan penambatan molekul (Kolina, *et al.*, 2018). Selain itu, dilakukan merge non polar pada atom hidrogen yang bertujuan untuk memastikan interaksi yang terjadi dengan reseptor estrogen- α saat proses penambatan molekuler hanya pada atom hidrogen polar saja.

Validasi metode docking menjadi langkah penting sebelum penambatan molekuler ligan uji. Validasi metode docking dilakukan dengan mendocking ulang ligan alami ke protein target. Grid box adalah salah satu parameter docking yang didefinisikan sebagai ruang ligan berikatan membentuk konformasi dengan protein target. Koordinat gridbox diperoleh dari posisi ligan alami tertambat pada reseptor. Pengaturan gridbox mencakup pengaturan koordinat dan grid center dan grid size. Berdasarkan reseptor dan kompleks ligan alami yang telah didapat, raloxifene digunakan sebagai ligan alami selama proses re-docking. Parameter gridbox yang diperoleh kemudian divalidasi dengan nilai RMSD. Nilai RMSD dikatakan baik apabila nilainya ≤ 2 Å. Semakin besar nilai RMSD menunjukkan semakin besar penyimpangan, yang artinya semakin besar kesalahan dalam proses docking ligan dengan reseptor (Pratama, *et al.*, 2021). Nilai RMSD yang baik juga menunjukkan bahwa hasil re-docking serupa dengan konformasi hasil kristalografi. Adapun nilai RMSD yang diperoleh dari hasil re-docking antara ligan alami (Raloxifene) dengan reseptor estrogen- α 7KBS sebesar 1.044 Å. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa parameter docking valid untuk diaplikasikan dalam proses penambatan molekuler ligan uji karena nilai RMSD ≤ 2 Å. Hal tersebut menandakan terdapat kemiripan posisi ligan alami sebelum dengan setelah proses re-docking. Visualisasi posisi ligan alami sebelum dan setelah re-docking dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Visualisasi Ligan Alami Sebelum (Hijau) dan Sesudah Proses Re-docking (Biru)

Selanjutnya, proses penambatan molekuler dapat dilakukan dengan parameter gridbox yang telah diperoleh dari hasil re-docking untuk diaplikasikan pada docking ligan uji dengan reseptor target. Adapun hasil yang diperoleh melalui proses docking diantaranya adalah nilai energi ikatan, konstanta inhibisi, dan interaksi asam amino yang meliputi ikatan hidrogen, ikatan Van der Waals, dan ikatan lainnya. Nilai energi ikatan yang kecil menunjukkan konformasi yang terbentuk antara ligan dengan reseptor stabil dan nilai negatif menunjukkan bahwa interaksi antara ligan dan reseptor berlangsung secara eksotermis atau spontan tanpa bantuan energi. Sebaliknya nilai energi ikatan yang besar menunjukkan ketidakstabilan kompleks yang terbentuk antara ligan dan reseptor, juga interaksi cenderung bersifat endotermis atau tidak spontan (Azis, *et al.*, 2016). Nilai konstanta inhibisi (K_i) menunjukkan kemampuan penghambatan suatu ligan terhadap aktivitas reseptor. Nilai K_i yang semakin kecil menunjukkan bahwa konsentrasi ligan yang diperlukan untuk menghambat reseptor juga semakin kecil. Hal tersebut berarti bahwa semakin kecil nilai K_i maka semakin kuat interaksi dan ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor (Puspita, *et al.*, 2022). Hasil docking ligan uji yang diperoleh kemudian dilihat hasilnya dengan aplikasi Autodock, juga divisualisasikan dengan Biovia Discovery Studio untuk melihat interaksi asam amino yang terdapat antara ligan dan reseptor. Data penambatan molekuler disajikan pada **Tabel 3**.

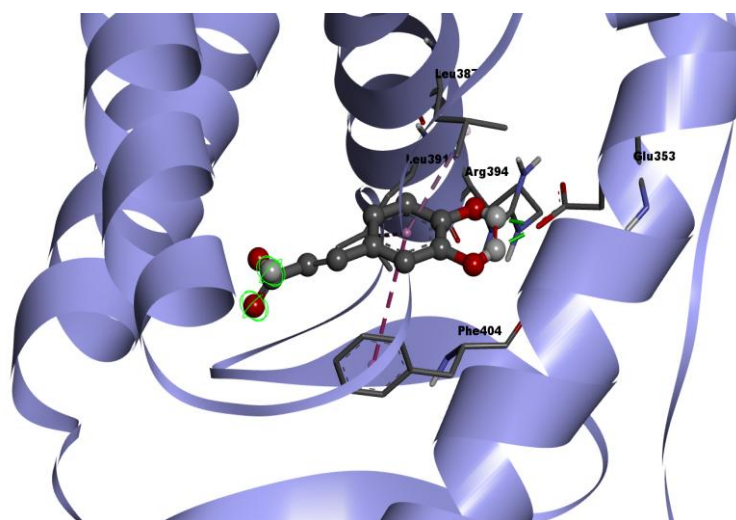
Tabel 3. Hasil Docking Molekuler

No	Nama Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (uM)	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Lain-lain
1	Raloxifene (Ligan Alami)	0.0	-14.60	0.0000197	ASP A: 351 GLU A: 353 GLY A: 521 HIS A: 524	-	ALA A: 350 LEU A: 354 TRP A: 383 LEU A: 387 MET A: 388 LEU A: 391 LEU A: 525 PRO A: 535 PHE A: 404
2	Caffeic Acid	0.0	-8.25	0.89976	LEU A: 346 GLU A: 353 ARG A: 394	-	ALA A: 350 LEU A: 387 MET A: 388 LEU A: 525
3	Catechin	0.0	-8.30	0.82	LEU A: 346 GLU A: 353 GLY A: 521	-	LEU A: 349 ALA A: 350 LEU A: 525 LEU A: 387 PHE A: 404
4	Chlorogenic Acid	0.0	-7.36	4.03	ASN A: 532 GLU A: 353 LEU A: 387 ARG A: 394 LEU A: 346	-	LEU A: 525 ALA A: 350
5	Ellagic Acid	0.0	-7.67	2.39	ARG: 394 GLU: 353	-	LEU A: 346 ALA A: 350 LEU A: 387 MET A: 388 LEU A: 391 PHE A: 404
6	Etil Brevifolia	0.0	-4.60	428.11	GLU A: 353 ARG A: 394	-	LEU A: 387 LEU A: 391 PHE A: 404
7	Ferulic Acid	0.0	-4.94	238.40	GLU A: 35	-	LEU A: 349 LEU A: 349 ALA A: 350 LEU A: 387 MET A: 388 LEU A: 404
8	Gallic Acid	0.0	-4.23	790.07	GLU A: 353 ARG A: 394	-	LEU A: 346 ALA A: 350 LEU A: 387 MET A: 388 LEU A: 391 PHE A: 404
9	p-Coumaric Acid	0.0	-4.74	334.64	GLU A: 353	-	LEU A: 349 ALA A: 350 LEU A: 387 PHE A: 404
10	Pedunculagin	0.0	-3.87	1460	THR A: 347 ASP A: 351 LEU A: 387	-	ALA A: 350 GLU A: 353 LEU A: 391

No	Nama Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kcal/mol)	Konstanta Inhibisi (uM)	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Lain-lain
					SER A: 530 ASN A: 532		ARG A: 394 MET A: 421
11	Quercetin	0.0	-7.92	1.55	LEU A: 346 LEU A: 387 ARG A: 394 GLY A: 521	-	LEU A: 349 ALA A: 350 LEU A: 391 ILE A: 424

Pada tabel 3, diperoleh data hasil docking ligan alami dengan ligan uji. Hasil yang diperoleh dari hasil re-docking ligan alami dapat digunakan untuk dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dari proses docking ligan uji untuk kemudian diperoleh ligan uji yang berpotensi sebagai obat. Proses docking kesepuluh ligan uji dilakukan dengan membuat 100 konformasi untuk memperoleh hasil yang optimal. Keseluruhan ligan uji terlihat memiliki nilai energi ikatan negatif yang berarti memberikan kestabilan konformasi yang baik. Selain itu, nilai konstanta inhibisi teramat beragam dari kesepuluh senyawa uji. Akan tetapi, caffeic acid dan catechin terlihat memiliki konstanta inhibisi yang kecil dibandingkan senyawa lainnya walaupun konstanta inhibisi keduanya tidak mendekati atau lebih rendah dibandingkan konstanta inhibisi ligan alami. Selain itu, hasil docking dilihat dari interaksi asam amino, dimana pedunculagin memiliki interaksi paling banyak dibandingkan dengan senyawa lain. Akan tetapi, pedunculagin tidak memenuhi dilihat dari nilai energi ikatan dan konstanta inhibisinya yang tinggi. Dengan demikian, caffeic acid dan catechin memiliki energi ikatan dan konstanta inhibisi yang baik. Artinya caffeic acid dan catechin membutuhkan sedikit energi untuk berinteraksi dengan reseptor estrogen- α sehingga afinitasnya lebih tinggi, hal tersebut didukung dengan konstanta inhibisi yang kecil artinya konsentrasi yang diperlukan caffeic acid dan catechin untuk menghambat reseptor estrogen- α sedikit.

Berdasarkan keseluruhan rangkaian studi *in silico*, diantara caffeic acid dan catechin diketahui caffeic acid lebih berpotensi sebagai obat. Hal tersebut didukung oleh hasil Lipinski Rule of Five (RO5) yang memenuhi, hasil preADMET yang memenuhi karena bersifat non-mutagen dan terakhir didukung oleh hasil penambatan molekuler yang juga memenuhi dilihat dari nilai energi ikatan dan konstanta inhibisinya. Caffeic acid sebagai senyawa uji membentuk beberapa interaksi dengan reseptor estrogen- α diantaranya adalah ikatan hidrogen dan interaksi lainnya yang dapat dilihat pada **Gambar 3**. Akan tetapi baik dari nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi tidak lebih baik dibandingkan ligan alami. Hal tersebut dapat terjadi karena minimnya interaksi caffeic acid dengan reseptor estrogen- α , juga interaksi lain lebih banyak terjadi pada ligan alami (Raloxifene) dibandingkan dengan interaksi caffeic acid dengan reseptor estrogen- α .



Gambar 3. Visualisasi interaksi Caffeic Acid dengan Estrogen- α

Simpulan

Berdasarkan pengujian RO5, ADMET, dan juga penambatan molekuler terhadap 10 senyawa uji yang merupakan metabolit sekunder tanaman buah delima, senyawa caffeic acid memiliki potensi terbaik sebagai obat. Caffeic Acid memenuhi RO5 dan juga ADMET, selain itu hasil penambatan molekuler yang juga memenuhi dengan nilai energi ikatan sebesar -8.25 kkal/mol) dan konstanta inhibisinya sebesar 0.89976 uM.

Daftar Referensi

- Azis, F.K., Nukitasari, C., Oktavianingrum, F.A., Ariyati, L.W. & Santoso, B. 2016. Hasil In Silico Senyawa Z12501572, Z00321025, SCB5631028 dan SCB13970547 dibandingkan Turunan Zerumbon terhadap Human Liver Glycogen Phosphorylase (115Q) sebagai Antidiabetes. *Jurnal Kimia VALENSI: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, 2(2):120-124.
- Camp, D., Garavelas, A., dan Campitelli, M. 2015. Analysis of Physicochemical Properties for Drugs of Natural Origin. *Journal of Natural Products*, 78(6): 1370-1382.
- Daneman, R. & Prat, A. 2015. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1): a020412.
- Dubach, V.R.A. & Guskov, A. 2020. The Resolution in X-ray Crystallography and Single-Particle Cryogenic Electron Microscopy. *Crystals*, 10(7):1-13.
- Harling, V. N. V. 2018. Penentuan Kadar Asam Elagat Ekstrak Metanol Kulit Buah dan Biji Buah Delima (*Punica granatum. L.*). *SOSCIED*, 1(2).
- Hartiningsih, H. & Anggraeni, D. 2016. Respon sistem homeostasis kalsium tikus ovariektomi yang mengkonsumsi kombinasi calcitriol dengan raloxifene. *Jurnal Sain Veteriner*, 34(1): 92-101.
- Hasan, R., I'annah, F.C. & Bahi, R.R.R. 2022. Docking Molekuler Senyawa Potensial Daun Kelor (*Moringa olifera*) Terhadap Reseptor Folat. *Journal of Innovation Research and Knowledge*, 2(2):519-526.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (KEMENKES RI). 2023. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/2171/2023 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tatalaksana Osteoporosis*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kolina, J., Sumiwi, S.A., dan Levita, J. 2019. Mode ikatan metabolit sekunder di tanaman akar kuning (*Arcangelisia flava L.*) dengan nitrat oksida sintase. *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1): 50-58
- Nusantoro, Y. R. & Fadlan, A. 2020. Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekuler Isatinil-2- Aminobenzoilhidrazon dan kompleks logam transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kimindo*, Vol 5(2): 114.
- Pambella, S. M. D. 2019. Potensi Tocotrienol Sebagai Terapi pada Kanker Payudara dengan Positif Estrogen. *Jurnal Kedokteran Ibnu Nafis*, 8(2): 41-47.
- Prasetyo, N. F., Kepel, B. J., Bodhi, W., Manampiring, A., & Budiarmo, F. 2021. Molecular Docking terhadap Senyawa Isoeuletherin dan Isoeuletherol sebagai Penghambat Pertumbuhan SARS-CoV-2. *eBiomedik*, 9(1).
- Prastyo, B., Ma'arif, A. S., Pratiwi, D. W., Udaibah, W., dan Abidin, Z. 2021. Skrining Fitokimia dan Analisis GC-MS dari Ekstrak Batang *Punica Granatum* (Studi Ayat Mengenai Delima dan QS. Ali Imran [3]: 191). *Prosiding Konferensi Integrasi Interkoneksi Islam dan Sains*, 3: 127-137.
- Pratama, A.B., Herowati, R. & Ansory, H.M. 2021. Studi Docking Molekuler Senyawa Dalam Minyak Atsiri Pala (*Myristica fragrans H.*) Dan Senyawa Turunan Miristinin Terhadap Target Terapi Kanker Kulit. *Majalah Farmaseutik*, 17(2):233-242.
- Puspita, P.J., Liliyani, N.P.P. & Ambarsari, L. 2022. In Silico Analysis of Active Compounds of Avocado Fruit (*Persea americana Mill.*) as Tyrosinase Enzyme Inhibitors. *Current Biochemistry*, 9(2):73-87.
- Rusnaldi, R., & Shalahuddin, S. 2022. Peran fitoestrogen sebagai terapi alternatif pada menopause. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 22(3).

- Wang, Y., Xing, J., Xu, Y., Zhou, N., Peng, J., Xiong, Z., Liu, X., Luo, X., Luo, C., Chen, K., Zheng, M., and Jiang, H. 2015. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Journals Cambridge*, 48(4), 488 –515.
- Wicaksono, D. S., & Maulana, R. Y. 2020. Manfaat Ekstrak Dandelion Dalam Mencegah Osteoporosis. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 2(2): 155-162.