



CURRENT BIOCHEMISTRY
ISSN: 2355-7877
e-ISSN: 2355-7931
Journal homepage: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj>
Journal E-mail: current.biochemistry@gmail.com

CB Current
Biochemistry

***In Silico* Analysis of Red Betel (*Piper crocatum*) Active Compounds as Xanthine Oxidase Inhibitors**

(Analisis *In Silico* Senyawa Aktif Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Inhibitor Xantin Oksidase)

Mega Safithri^{1*}, Shafillah Miantika¹, Laksmi Ambarsari¹

¹*Department of Biochemistry, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia*

Received: 24 November 2022 ; Accepted: 14 December 2022

*Corresponding author : Mega Safithri, Departemen Biokimia IPB: e-mail: safithri@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Excess uric acid causes swelling, pain and stiffness in the joints. One alternative is to inhibit the activity of the enzyme xanthine oxidase. This study aimed to identify the active compound of red betel that can inhibit the activity of the xanthine oxidase through molecular docking (*in silico*). Receptor and ligands were obtained from data bases. Molecular docking was carried out using the Autodock Vina Tools. The size of the center retardation were $x = 26,7853$; $y = 9,9800$; $z = 113,3917$ with dimension value $x = 14$; $y = 14$; $z = 18$. The results of molecular docking showed that protocatechin acid and 2-(3,4-dimethoxy phenyl)-6-ethoxy-7-methoxy-1-naphthol were potential as xanthine oxidase inhibitors ($\Delta G = -7.6$ kcal/mol and $K_i = 2.679$) which is better than the commercial drug Allopurinol ($\Delta G = -7.4$ kcal/mol and $K_i = 3.764$), and binds to the active site residues Arg880 and Thr1010 in the Mo domain which is the target site for competitive inhibitors such as Allopurinol and natural inhibitors (salicylic acid).

Keywords: gout, inhibition, molecular docking, red betel leaves

ABSTRAK

Asam urat berlebih mengakibatkan pembengkakan, rasa nyeri dan kaku dipersendian. Salah satu alternatif adalah dengan menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa aktif sirih merah sebagai inhibitor enzim xantin oksidase melalui penambatan molekuler (*in silico*) terarah (*site directed docking*). Reseptor dan ligan diperoleh dari basis data. Penambatan molekul dilakukan menggunakan software Autodock Vina Tools. Ukuran pusat penambatan molekuler sebesar $x = 26,7853$; $y = 9,9800$; $z = 113,3917$ dengan nilai dimensi $x = 14$; $y = 14$; $z = 18$. Hasil penambatan molekul menunjukkan bahwa asam protokatekuat dan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7-metoksi-1-naftol berpotensi sebagai inhibitor xantin oksidase ($\Delta G = -7,6$ kkal/mol dan $K_i = 2,679$) yang lebih baik dibandingkan obat komersial Allopurinol ($\Delta G = -7,4$ kkal/mol dan $K_i = 3,764$), serta mengikat sisi aktif residu Arg880 dan Thr1010 pada Mo domain yang menjadi sisi target inhibitor kompetitif seperti Allopurinol maupun inhibitor alami (asam salisilat).

Kata kunci: daun sirih merah, inhibisi, gout, penambatan molekuler

1. PENDAHULUAN

Hiperurisemia adalah jumlah kadar asam urat di darah tinggi karena sintesis asam urat yang berlebih dan ekskresinya berkurang, sehingga terjadi endapan Na-urat pada sendi dan organ ginjal (Ling dan Bochu 2014). Enzim xantin oksidase berperan dalam mengkatalisis hidrosilasi dari hipoxantin menjadi xantin, kemudian xantin menjadi asam urat (jalur degradasi purin). Dengan demikian, xantin oksidase adalah enzim kunci dalam meningkatkan kadar asam urat dalam darah (Bustanji et al. 2011). Allopurinol (obat sintetik) adalah inhibitor dari enzim xantin oksidase, akan tetapi penggunaan berlebih memiliki efek samping pada tubuh seperti pencernaan yang terganggu, kerusakan organ hati, nefropati, alergi, dan berkurangnya sel darah putih (Khanna et al., 2012), sehingga dibutuhkan terapi alternatif herbal akibat adanya efek samping allopurinol. Salah satu herbal yang potensi sebagai antihiperuresemia adalah sirih merah (*Piper crocatum*).

Ekstrak etanol daun sirih merah (*P. corcatum*) terbukti secara pra klinis pada mencit jantan sebagai antihiperuresemia dengan mereduksi 60.51% kadar asam urat dengan dosis 0,0041 g/kg bb (Laili et al. 2019). Namun demikian, penelitian terkait senyawa aktif sirih merah yang berperan sebagai inhibitor enzim xantin oksidase secara *in silico* belum ada. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa aktif sirih merah yang dapat menginhibisi aktivitas enzim xantin oksidase melalui penambatan molekuler (*in silico*).

2. METODOLOGI

Analisis *in silico* penelitian ini memakai reseptor protein struktur tiga dimensi xantin oksidase (kode PDB:1FIQ) diambil dari database bank data protein pada <https://www.rcsb.org/search>. Ligan uji (89 senyawa aktif sirih merah), (ligan alami) asam salisilat, dan ligan pembanding (allopurinol).

Ligan didapat dari basis data *PubChem Compound* dengan format SDF (*Structure Data File*). Seluruh ligan dioptimasi geometri menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2016* dan *AutoDock Tools 1.5.6*. Ligan optimal kemudian ditapis secara virtual menggunakan *PyRx* (Modifikasi Pratama et al. 2016).

Seleksi ligan terbaik dilakukan dengan menganalisis kelarutan Lipinski pada laman <http://www.scfbio-uitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> (Modifikasi Nogara et al. 2014). Prediksi toksisitas ligan uji dilakukan menggunakan perangkat lunak online *Admetstar 1.0* (Ochieng et al. 2017). Penambatan molekuler menggunakan *software Autodock Vina Tools* dilakukan pada grid box daerah pusat $x=26.7853$; $y=9.9800$; $z=113.3917$ dengan nilai dimensi $x=14$; $y=14$; $z=18$ spasi= 0.375. Hasil dianalisis berdasarkan energi ikatan yang dihasilkan (modifikasi Singh et al. 2017). Analisis interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen dilakukan dengan mengoperasikan *software Ligplot+ 1.4.5* dengan radius interaksi kurang dari 5Å (Pratama et al. 2016).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penapisan virtual 89 senyawa sirih merah, dilanjutkan dengan tahapan seleksi terhadap senyawa penciri sirih merah berdasarkan database pada <http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id>. Hasil seleksi menunjukkan terdapat 50 senyawa yang merupakan senyawa penciri sirih merah dan 4 diantaranya memiliki nilai energi ikatan sama atau lebih negatif dibandingkan asam salisilat. Asam salisilat memiliki nilai energi ikatan sebesar -7,7 kkal/mol. Selain itu, terdapat 16 senyawa khas sirih merah yang memiliki nilai Energi ikatan diantara nilai energi ikatan asam salisilat dan allopurinol yaitu direntang nilai Energi ikatan -7,7 kkal/mol dan -6,4 kkal/mol.

Hasil penapisan ligan berdasarkan aturan Lipinski terutama pada nilai bobot molekul, menunjukkan bahwa ligan [4-[(3,4,5-trietoksibenzoil)oksimetil]fenil]metil 3,4,5-trietoksibenzoat memiliki penyerapan dan permeabilitas yang kurang di dalam tubuh, karena berat molekulnya > 500 Da (Lipinski, 2004). Berdasarkan nilai logP, terdapat 6 senyawa yang memiliki nilai logP lebih dari 5. Nilai logP merupakan parameter yang berhubungan dengan polaritas ligan dalam pelarut non polar, pelarut minyak maupun lemak. Senyawa aktif dengan nilai log P > 5 akan lebih mudah melewati lapisan lipid bilayer pada membran sel, sehingga terdistribusi luas di dalam tubuh. Menurut Isnaeni *et al.* (2016), apabila nilai log P semakin negatif, maka senyawa aktif bersifat lebih terdistribusi pada fase polar, yang menunjukkan senyawa aktif hanya larut dalam cairan tubuh, namun sulit untuk melewati membran sel, akibatnya sulit berikatan dengan reseptor yang ada pada membran sel tersebut.

Hasil penapisan ligan berdasarkan aturan Lipinski terutama nilai refraktivitas molar menunjukkan bahwa ligan isobenzofuran-4,7-dion, Z-11-Tetradesen-1-ol-trifluoroasetate, asam protokatekuat dan 4-(4-metoksifenilamino)-2,3-dihidro-1H-4a,9-diaza-siklopenta(b)fluorin-10-karbonitril memiliki refraktivitas molar lebih kecil dari 40 sedangkan [4-[(3,4,5-trietoksibenzoil)oksimetil]fenil]metil 3,4,5-trietoksibenzoat memiliki refraktivitas molar lebih besar dari 130. Refraktivitas molar dapat menjadi salah satu parameter yang membedakan suatu senyawa dapat diserap atau tidak. Senyawa yang dapat diserap mempunyai nilai refraktivitas yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa yang tidak dapat diserap oleh tubuh (Chedik *et al.* 2017).

Parameter lainnya pada aturan Lipinski yaitu suatu ligan harus memiliki donor hidrogen kurang dari 5 dan akseptor hidrogen kurang dari 10. Jumlah donor dan akseptor

hidrogen berkaitan dengan kapasitas ikatan hidrogen. Donor dan akseptor ikatan hidrogen dapat menunjukkan energi yang dibutuhkan senyawa aktif untuk dapat diabsorpsi oleh tubuh. Kapasitas ikatan hydrogen yang semakin tinggi menunjukkan bahwa energi yang dibutuhkan dalam proses penyerapan dalam tubuh semakin besar, sehingga ligan akan sulit diabsorpsi (Syahputra *et al.* 2014). Senyawa [4-[(3,4,5-trietoksibenzoil)oksimetil]fenil]metil 3,4,5-trietoksibenzoat termasuk ke dalam ligan uji yang tidak memenuhi aturan Lipinski karena 4 dari 5 aturan tidak sesuai dengan aturan Lipinski (Tabel 1). Berdasarkan hasil analisis aturan Lipinski, terdapat 19 senyawa bioaktif sirih merah yang lolos untuk dilakukan prediksi toksisitas ligan.

Hasil pengujian toksisitas berdasarkan metode klasifikasi ADMET dapat digunakan dalam menentukan derajat kerusakan yang dapat disebabkan oleh suatu molekul obat dan menentukan batas pemberian dosis. Hasil prediksi karsinogenik menunjukkan semua ligan termasuk ke dalam kategori senyawa non-karsinogenik, kecuali trans-beta-Farnesene dan Z-11-tetradesen-1-ol-trifluoroasetat yang bersifat karsinogenik (Tabel 2). Toksisitas akut merujuk pada pengaruh toksik yang diamati akibat asupan dosis tunggal secara oral pada selang waktu 24 jam. Hasil analisis toksisitas menunjukkan bahwa ligan isobenzofuran-4,7-dion dan N-metiloktadesilamin termasuk ke dalam kategori II dengan nilai ≤ 300 mg/kg sehingga bersifat lebih toksik. Sofalkon dan asam 1,2-benzendikarboksilat termasuk ke dalam kategori IV (≤ 5000 mg/kg) yang berarti tidak lebih toksik dibandingkan isobenzofuran-4,7-dion dan N-metiloktadesilamin. Semakin kecil kategori suatu senyawa maka semakin berbahaya senyawa tersebut (Safithri *et al.* 2012). Berdasarkan prediksi toksisitas ligan, terdapat 14 senyawa yang lolos untuk dilakukan uji penambatan molekular.

Penambatan molekuler dilakukan pada 14 senyawa penciri sirih merah yang telah lolos pada prediksi toksisitas ligan. Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa terdapat 5 ligan uji yang memiliki energi ikatan yang lebih negatif dibanding allopurinol (Tabel 3). Nilai energi ikatan

menunjukkan tingkat kestabilan ikatan antara ligan dan reseptor, jika nilainya semakin negatif maka tingkat kestabilan ikatan ligan dan reseptor semakin tinggi, sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat dan reaksi antara ligan dan reseptor berlangsung secara spontan (Murray 2012).

Tabel 1 Kelarutan ligan sirih merah berdasarkan aturan Lipinski

No	Senyawa	Masa atom relatif (Da)	Donor ikatan hidrogen	Akseptor ikatan hidrogen	LogP	Refraktivitas Molar
1	Alilpirokatekol	134	1	1	2,1207	42,00779
2	Sofalkon	450	1	6	5,7361	129,23126
3	Metil 3-(4-hidroksi-2-okso-2H-kromen-3-il)-3-(4-(oktiloksi)fenil)propanoat	452	1	6	5,9609	126,31275
4	[4-[(3,4,5-Trietoksibenzoil)oksimetil]fenil]metil 3,4,5-trietoksibenzoat	610	0	10	6,7928	164,57919
5	Isobenzofuran-4,7-dion	148	0	3	1,2148	36,50899
6	N-Metiloktadesilamin	283	1	1	6,4673	93,47266
7	Urapidil	387	1	8	1,1621	108,27865
8	N-[2-(7-Benzhidriloksinaftalen-1-il)etil]siklopropanakarboksamid	421	1	3	6,0769	128,74066
9	Trans-beta-Farnesen	204	0	0	5,2015	70,99298
10	2-Metoksi-4-vinilfenol	150	1	2	2,0438	44,74979
11	2,6-Dimetil-3-(metoksimetil)-p-benzokuinon	180	0	3	1,0474	48,34698
12	Asam 1,2-Benzenedikarboksoli	166	2	4	1,0830	40,36060

Lanjutan...

No	Senyawa	Masa atom relatif (Da)	Donor ikatan hidrogen	Akseptor ikatan hidrogen	LogP	Refraktivitas Molar
13	Z-11-Tetradesen-1-ol-trifluoroasetat	114	2	3	1,1950	21,12610
14	5-isopropil-3- pirazolidin karbohidrazid	172	5	5	-1,133	45,63249
15	Asam protokatekuat	154	3	4	0,7960	36,73090
16	2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol	354	1	5	4,6369	101,87377
17	6XO32ZSP1D	210	1	4	1,7210	55,50278
18	N-1,N-9-Bis[ε-(2-nitrofenil)metilen]nonane dihidraze	482	2	10	3,8341	129,98516
19	4-(4-metoksifenilamino)-2,3-dihidro-1H-4a,9-diaza-siklopenta(b)fluorine-10-karbonitril	354	1	4	4,6001	4,60007
20	6-Amino-4-[3-(benziloksi)fenil]-3-tert-butil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-karbonitril	400	3	5	4,6001	114,02008

Tabel 2 Prediksi toksisitas ligan

Nama Ligan	hERG		Karsinogenisitas		Toksistas oral akut	
	Kategori	Skor	Kategori	Skor	Kategori	Skor
Asam salisilat	Inhibitor lemah	0,946	Non-karsinogenik	0,849	III	0,828
Allopurinol	Inhibitor lemah	0,940	Non-karsinogenik	0,912	III	0,574
Alilpirokatekol	Inhibitor lemah	0,717	Non-karsinogenik	0,733	II	0,537
sofalkon	Inhibitor lemah	0,958	Non-karsinogenik	0,831	IV	0,629
Metil 3-(4-hidroksi-2-okso-2H-kromen-3-il)-3-(4-(oktiloksi)fenil)propanoat	Inhibitor lemah	0,829	Non-karsinogenik	0,945	III	0,401
Isobenzofuran-4,7-dion	Inhibitor lemah	0,907	Non-karsinogenik	0,934	II	0,426
N-Metiloktadesilamin	Inhibitor lemah	0,691	Non-karsinogenik	0,607	II	0,678
Urapidil	Inhibitor	0,516	Non-	0,765	III	0,771

N-[2-(7-Benzhidriloksinaftalen-1-il)etil]siklopropanakarboksamid	lemah Inhibitor lemah	0,898	karsinogenik Non- karsinogenik	0,919	III	0,648
Trans-beta-Farnesen	Inhibitor lemah	0,769	Karsinogenik	0,569	III	0,908
2-Metoksi-4-vinilfenol	Inhibitor lemah	0,895	Non- karsinogenik	0,852	III	0,860
2,6-Dimetil-3-(metoksimetil)-p-benzokuinon	Inhibitor lemah	0,831	Non- karsinogenik	0,744	III	0,533
Asam 1,2-Benzendikarboksilat	Inhibitor lemah	0,982	Non- karsinogenik	0,747	IV	0,728
Z-11-Tetradesen-1-ol-trifluoroasetate	Inhibitor lemah	0,915	Karsinogenik	0,807	III	0,679
5-isopropil-3-pirazolidin karbohidrazid	Inhibitor lemah	0,996	Non- karsinogenik	0,734	III	0,603
Asam protokatekuat	Inhibitor lemah	0,982	Non- karsinogenik	0,915	III	0,506
2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol	Inhibitor lemah	0,968	Non- karsinogenik	0,815	III	0,644
6XO3ZSP1D	Inhibitor lemah	0,949	Non- karsinogenik	0,940	III	0,767
N-1,N-9-Bis[ε-(2-nitrofenil)metilen]nonanedihidraze	Inhibitor lemah	0,821	Non- karsinogenik	0,756	III	0,610
4-(4-metoksifenilamino)-2,3-dihidro-1H-4a,9-diazasiklopenta(b)fluorin-10-karbonitril	Inhibitor lemah	0,683	Non- karsinogenik	0,972	III	0,589
6-Amino-4-[3-(benziloksi)fenil]-3-tert-butyl-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-karbonitril	Inhibitor lemah	0,983	Non- karsinogenik	0,832	III	0,580

Ligan alami memiliki nilai energi ikatan sebesar 7.7 kkal/mol, sedangkan allopurinol memiliki nilai energi bebas Gibbs sebesar 7.4 kkal/mol. Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahawa terdapat 2 senyawa yang memiliki nilai energi ikatannya yang lebih negatif dibandingkan dengan Energi ikatan ligan alami, yaitu N-[2-(7-benzhidriloksinaftalen-1-il)etil]siklopropanakarboksamid sebesar -11.8

kkal/ml dan N-1,N-9-bis[ε-(2-nitrofenil)metilen]nonanedihidraze sebesar -8.2 kkal/mol. Sebanyak 4 ligan uji yang memiliki nilai energi ikatan diantara nilai energi ikatan ligan alami dan allopurinol, yaitu sofalkon, asam 1,2-benzendikarboksilat, dan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol, dan asam protokatekuat (Tabel 3). Energi bebas Gibbs berdasarkan termodinamika menunjukkan proses adsorpsi

yang spontan jika nilainya kurang dari nol ($\Delta G < 0$) dan tidak spontan apabila nilainya lebih dari nol ($\Delta G > 0$) (Du *et al.* 2021). Dengan demikian, semakin kecil nilai energi bebas Gibbs maka interaksi antara ligan dan reseptor semakin spontan dan membutuhkan energi yang sedikit untuk melakukan penambatan molekuler. Besar kecilnya energi bebas Gibbs (ΔG) ditentukan oleh kontribusi ikatan ionic, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi Van der Waals yang terjadi pada interaksi reseptor dengan ligan, sehingga menghasilkan nilai afinitas pengikatan (Ashraf *et al.* 2021).

Parameter lain dalam melihat kekuatan interaksi antara ligan dan reseptor adalah nilai konstanta inhibisi. Nilai konstanta inhibisi dapat diperoleh dari persamaan

$$\Delta G = -RT \ln K$$

Berdasarkan hasil perhitungan semakin negatif nilai energi ikatan, maka akan semakin kecil juga nilai konstanta inhibisi yang didapat. Nilai konstanta inhibisi tertinggi diperoleh dari ligan sofalkon, yaitu sebesar 3,764, sedangkan nilai konstanta inhibisi terendah diperoleh dari ligan N-[2-(7-benzhidriloksinaftalen-1-il)etil]siklopropanakarboksamid, yaitu sebesar 0,0022 μM (Tabel 3). Nilai afinitas (energi ikatan) berbanding lurus dengan nilai K_i . Pengikatan suatu ligan sebagai inhibitor kompetitif ditunjukkan dengan nilai K_i pada rentang nilai mikromolar yang rendah (Ramsay *et al.* 2017). Tambunan dan Alamudi (2010), semakin kecil nilai konstanta inhibisi dan semakin negatif nilai energi ikatan dapat meningkatkan energi torsional, sehingga ikatan yang terbentuk antara senyawa aktif dan enzim sangat kuat dan stabil.

Tabel 3 Penambatan molekuler senyawa sirih merah terhadap xantin oksidase

No	Nama ligan	Energi ikatan (kkal/mol)	Konstanta inhibisi (μM)
1	Asam salisilat (ligan alami)	-7,7	2,338
2	Allopurinol (obat komersil)	-7,4	3,764
3	N-[2-(7-Benzhidriloksinaftalen-1-il)etil]siklopropanakarboksamid	-11,8	0,0022
4	N-1,N-9-Bis[ϵ -(2-nitrofenil)metilen]nonanedihidraze	-8,2	0,976
5	Asam protokatekuat	-7,6	2,679
6	2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol	-7,6	2,679
7	asam 1,2-Benzendikarboksilat	-7,5	3,176
8	Sofalkon	-7,4	3,764

Hasil penambatan molekuler membutuhkan visualisasi untuk melihat residu asam amino yang berperan membuat iaktan antara ligan dan reseptor. Residu yang membuat ikatan dengan ligan memiliki

interaksi yang dapat meningkatkan afinitas dan aktivitas inhibisi terhadap enzim xantin oksidase. Interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen menentukan stabilitas ikatan antara senyawa aktif dengan proteinnnya. Bila ikatan hidrogen banyak disertai dengan interaksi

hidrofobik, maka dapat dikatakan bahwa interaksi ligand dan reseptor tersebut merupakan interaksi yang kuat (Ummah *et al.* 2020).

Hasil visualisasi penambatan molekuler menunjukkan bahwa asam protokatekuat memiliki residu asam amino yang berikatan hidrogen terbanyak dibanding ligan lainnya yaitu sebanyak 5 residu (Tabel 4). Asam protokatekuat memiliki 5 residu yang berikatan secara hidrogen berupa Thr1010, Val1011, Glu802, Ala1079, dan Arg880. Ligan asam protokatekuat lebih kuat interaksinya terhadap reseptor jika dibandingkan dengan allopurinol, karena

allopurinol hanya memiliki 3 residu asam amino yang berikatan hydrogen. Berbeda dengan asam protokatekuat, ligan N-1,N-9-bis[ϵ -(2-nitrofenil)metilen]nonanedihidraze tidak memiliki residu yang berikatan secara hidrogen. Ligan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol memiliki jarak ikatan terjauh dibandingkan ligan lainnya, yaitu pada residu Thr1010 sebesar 3.98 Å. Jarak ikatan terpendek dimiliki oleh residu Glu1261 pada ligan sofalkon. Ligan N-1,N-9-bis[ϵ -(2-nitrofenil)metilen]nonanedihidraze tidak memiliki jarak ikatan karena tidak terdapat residu asam amino yang berikatan hirdogen.

Tabel 4 Interaksi residu asam amino pada sisi aktif xantin oksidase

No	Nama ligan	Berikatan hidrogen (jarak ikatan)	Berikatan hidrofobik	Mo domain
1	Asam salisilat	Arg880 (3.08 Å), Thr1010 (2.85 Å), Val1011 (3.31 Å) (3)	Ala1079, Phe1009 , Phe914 , Leu873, Glu802, Leu1014 (6)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
2	Allopurinol	Arg880 (2.98 Å), Thr1010 (2.84 Å) Glu802 (3.21 Å) (3)	Ala1079, Phe1009 , Phe914 , Leu873, Ala1078 (5)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
3	Sofalkon	Glu1261 (2.71 Å), Ala1079 (2.84 Å), Ser1008 (3.30 Å), Arg880 (2.81 Å) (4)	Ser1080, Gly799, Phe798, Arg912, Ala1078, Val1011, Phe914 , Glu802, Leu648, Pro1076, Phe1013, Lys771, Leu1014, Leu873, Phe1009 , Ser876, Phe1005, Gly1006 (18)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
4	N-[2-(7-Benzhidriloksinaftalen-1-ilet)etil]siklopropana karboksamid	Glu802 (2.94 Å) (1)	Glu1261 , Phe911, Gly799, Ala1078, Ala1079, Arg912, Gln767, Ala910, Phe914 , Arg880, Phe1009 , Leu873, Leu1014, Phe649, Phe1013, Lys771, Asn768, Ser876, Thr1010 , Val1011, Leu648 (21)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009

Lanjutan...

No	Nama ligan	Berikatan hidrogen (jarak ikatan)	Berikatan hidrofobik	Mo domain
5	asam 1,2-Benzendikarboksilat	Arg880 (2.80 Å), Ser1008 (2.82 Å), Val1011 (3.01 Å) (3)	Phe1009, Ser876, Leu1014, Glu802, Thr1010, Phe914, Ala1079 (7)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
6	Asam protokatekuat	Thr1010 (2.84 Å), Val1011 (3.33 Å), Glu802 (2.68 Å), Ala1079 (3.17 Å), Arg880 (3.03 Å) (5)	Phe1009, Phe914, Ala1078 (3)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
7	2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7-metoksi-1-naftol	Arg880 (3.03 Å), Thr1010 (3.98 Å), Ser876 (3.78 Å) (3)	Lys771, Val1011, Phe1013, Phe649, Leu873, Leu1014, Glu802, Leu648, Phe1009, Phe914, Glu1261, Ala1079 (12)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009
8	N-1,N-9-bis[ε-(2-nitrofenil)metilen]non anedihidraze	-	Phe798, Phe911, Gly799, Phe914, Ala1079, Glu1261, Ala910, Leu1014, Ala1078, Thr1010, Val1011, Ser876, Phe1013, Leu873, Leu648, Pro1076, Phe1009, Glu802, Arg912, Gln767, Thr1077, Met1038 (22)	Arg880, Thr1010, Glu1261, Phe914, Phe1009

Keterangan: **cetak tebal** merupakan residu asam amino yang berikatan terhadap domain MO

Domain molibdopterin berfungsi sebagai tempat pengikatan substrat tempat terjadinya reaksi oksidasi. Hidroksilasi oksidatif dari substrat purin terjadi di pusat

molibdenum, yang menghasilkan reduksi dua elektron dari enzim. Salisilat sebelumnya telah terbukti sebagai penghambat kompetitif untuk substrat yang mengikat di situs aktif Mo

(Enroth *et al.* 2000; Pauff *et al.* 2008). Domain Mo merupakan situs katalitik yang digunakan sebagai patokan dalam melihat interaksi residu asam amino. Residu asam amino yang berinteraksi terhadap situs pengikatan aktif Mo yaitu Arg880, Thr1010, Glu126, Phe914, dan Phe1009. Berdasarkan hasil penelitian (Tabel 4), asam salisilat dan allopurinol berinteraksi terhadap residu asam amino Arg880, Thr1010, Phe914, dan Phe1009. Ligan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol memiliki interaksi residu asam amino yang sama terhadap domain Mo secara hidrofobik maupun hidrogen.

Berdasarkan daerah pengikatan residu, ligan yang memiliki interaksi yang cukup kuat terhadap xantin oksidase (IFIQ) yaitu asam protokatekuat, 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol, dan sofalkon. Hal ini dikarenakan ligan tersebut memiliki 2 residu ikatan hidrogen yang sama dengan residu pada Mo domain. Berdasarkan golongan metabolit sekunder, ligan sofalkon termasuk ke dalam golongan flavonoid yang larut dalam pelarut air (Safithri *et al.* 2016), sedangkan ligan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol dan asam protokatekuat merupakan senyawa tanin yang larut dalam pelarut n-heksan (Safithri *et al.* 2022).

Oleh karena itu, penambatan molekuler menghasilkan 5 senyawa penciri sirih merah yang memiliki nilai ΔG lebih negatif dibandingkan allopurinol. Ligan asam protokatekuat dan 2-(3,4-dimetoksi fenil)-6-etoksi-7- metoksi-1-naftol berpotensi paling baik dalam menghambat aktivitas xantin oksidase karena memiliki nilai ΔG sebesar -7,6 kkal/mol, nilai K_i sebesar 2,679 serta mengikat sisi aktif residu Arg880 dan Thr1010 pada Mo domain. Sofalkon juga berpotensi baik dalam menginhibisi xantin oksidase karena memiliki nilai K_i dan ΔG sama dengan allopurinol juga mengikat sisi aktif residu Arg880 dan Glu1261 pada Mo domain.

Perlu dilakukan analisis dinamika molekuler untuk melihat stabilitas kekuatan ikatan tiap ligan uji pada penelitian *in silico* ini. Pengujian *in vitro* dan *in vivo* perlu dilakukan untuk mengetahui daya dan jenis inhibisi senyawa sirih merah terhadap xantin oksidase yang mengkatalisis sintesis asam urat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih yang tulus kepada Rini Kurniasih, S.Si, M.Si karena telah berkontribusi dalam menelaah dan memberikan informasi terkait penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashraf SA, Elkhalifa AEO, Mehmood K, Adnan M, Khan MA, Eltoum NE, Krishnan A, Baig MS. 2021. Multi-targeted molecular docking, pharmacokinetics, and drug-likeness evaluation of okra-derived ligand abscisic acid targeting signaling proteins involved in the development of diabetes. *Molecules*. 26(5957): 1-23.
- Bustanji Y, Hudaib M, tawaha k, Mohammad MK, Almasri I, Hamed S, Oran S. 2011. In vitro xanthine oxidase inhibition by selected jordanian medicinal plants. *Jourdan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(1): 49-56.
- Chedik L, Mias-Lucquin D, Bruyere A, Fardel O. 2017. In silico prediction for intestinal absorption and brain penetration of chemical pesticides in human. *International Journal of Enviromental Research and Public Health*. 14(6): 708-724.
- Du X, Cheng Y, Liu Z, Yin H, Wu T, Huo L, Shu C. 2021. CO₂ and CH₄ adsorption on different rank coals: A thermodynamics study of surface potential, Gibbs free energy change and entropy loss. *Fuel*. 283(118886):1-11.

- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino To, Nishino Ta, Pai EF. 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *PNAS*. 97(20): 10723-100728.
- Isnaeni L, Kasmui, Kusuma SBW. 2016. Kajian hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas antioksidasi senyawa analog kalkan. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 5(2): 119-123.
- Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh MK, Neogi T, et al. 2012 American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout . Part 1 : Systematic Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapeutic Approaches to Hyperuricemia. 2012;64(10):1431–46.
- Laili NF, Savitri L, Probosiwi N. 2019. Uji aktivitas ekstrak etanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* terhadap penurunan kadar asam urat darah mencit jantan putih. *Jurnal Inovasi Farmasi Indonesia*. 1(1):1-10.
- Ling X, Bochu W (2014) A Review of phytotherapy of gout: Perspective of new pharmacological treatments. *Pharmazie*. 69:243–256. doi: 10.1691/ph.2014.3642.
- Lipinski, C. A., 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 1(4): 337–341. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennely PJ, Rodwell VW, Weil PA. 2012. *Biokimia Harper Edisi 29*. Jakarta(ID): Penerbit EGC.
- Nogara PA, Saraiva RDA, Bueno PC, Lissnerr LJ, Corte CLD, Braga MM, Rosemberg DB, Rocha JBT. 2014. Virtual screening of acetylcholinesterase inhibitor using the lipinski's rule of five and zinc databank – Review article. *Biomed Research International*. doi:10.1155/2015/870389. 1-8.
- Ochieng PJ, Sumaryada T, Okun D. 2017. Molecular docking and pharmacokinetic of herbal derivates as maltase-glucoamylase inhibitor. *Asian J Pham Cilin Res*. 10(9): 392-398.
- Pauff JM, Zhang J, Bell CE, Hille R. 2008. Substrate orientation in xanthine oksidase crystal struktur of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(8) : 4818-4824. DOI 10.1074/jbc.M707918200.
- Pratama R, Ambarsari L, Sumaryada TI. 2016. Molecular interaction analysis of COX-2 against curcuminoid and xanthorizol ligand as anti breast cancer using molecular docking. *Current Biochemistry*. 2(3): 139-149.
- Ramadani F. 2018. Aktivitas antioksidan daun, total tannin ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) dan identifikasi dengan LC-MS [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules*. 2017; 22(7): 1-46.
- Safithri M, Kurniawati A, Syaefudin. 2016. Formula of *Piper crocatum*, *Cinnamomum burmanii*, and *Zingiber officinale* extracts as a functional beverage for diabetics. *International Food Research Journal*. 23(3):1123-1130.
- Safithri M, Yasni S, Bintang M, Ranti AS. 2012. Toxicity study of antidiabetics functional drink of *Piper crocatum* and *Cinnamomum burmannii*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 19(1): 31-16. doi: 10.4308/hjb.19.1.31.
- Safithri M, Faridah DN, Ramadani F, Pratama R. 2022. Antioxidant activity of ethanol extract and fractions of *Piper crocatum* with Rancimat and cuprac

methods. *Turk J Biochem* 1-7.
<https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0300>

Syahputra G, Ambarsari L, Sumaryada T.
2014. Simulasi Docking Senyawa
Kurkumin dan Analognya Sebagai
Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase.
Jurnal Biofisika. 10(1) : 55-67.

Tambunan, USF, Alamudi, S. 2010. Designing
cyclic peptide inhibitor of dengue virus
NS3-NS2B protease by using
molecular docking approach.
Bioinformation. 5(6):250-254.