

Studi In Silico Senyawa Fenolik Madu sebagai Kandidat Inhibitor Mpro SARS-CoV-2

In Silico Study of Phenolic Compounds from Honey as Mpro SARS-CoV-2 Inhibitor Candidates

Pamungkas Rizki Ferdian,*Rizki Rabeca Elfirta, Azra Zahrah Nadhirah Ikhwani, Kasirah, Haerul, Dodi Sutardi, dan Gunawan Ruhiat

Pusat Riset Biologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jln. Raya Bogor KM. 46, Cibinong Science Center, Kabupaten Bogor, Jawa Barat, Indonesia

*Korespondensi Penulis : pamungkasferdian.biochemistry@gmail.com

Submitted: 24-05-2021, Revised: 20-09-2021, Accepted: 29-09-2021

DOI: <https://doi.org/10.22435/mpk.v31i3.4920>

Abstrak

SARS-CoV-2 menyebabkan pandemi COVID-19 secara global sejak akhir 2019 dan kasusnya dilaporkan belum berakhir sampai saat ini. Salah satu cara untuk mengatasi pandemi COVID-19 diantaranya dengan menemukan inhibitor *main viral protease* (Mpro) SARS-CoV-2 yang merupakan enzim kunci pada replikasi virus. Madu merupakan produk turunan lebah yang mengandung berbagai senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antivirus. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan kandidat inhibitor Mpro SARS-CoV-2 dari senyawa fenolik madu menggunakan simulasi penambatan molekuler secara terarah. Sebanyak 27 ligan uji (dari senyawa fenolik madu), 4 ligan pembanding (dari senyawa antiviral sintetik), dan ligan acuan (senyawa N3) diskirining karakternya sebagai senyawa obat dengan aturan Lipinski dan toksisitasnya dengan admetSAR. Semua ligan ditambatkan ke reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY menggunakan AutoDock Tools 1.5.6 dan Autodock Vina dengan pusat koordinat: X= 10,398; Y= -1,254; Z= 23,473 dan ukuran kisi: X= 40; Y= 46; Z= 40. Simulasi penambatan molekuler menghasilkan data energi afinitas dan interaksi molekuler. Hasil penelitian menunjukkan kandidat inhibitor Mpro SARS-CoV-2 terbaik dari senyawa fenolik madu adalah genistein karena memenuhi semua aturan Lipinski, tidak toksik, bukan karsinogen, memiliki energi afinitas -7,6 kKal/mol, kemiripan 80% dengan ligan acuan N3, dan menempati 63,64% area cakupan penambatan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Kata kunci : madu; senyawa fenolik; penambatan molekuler; pandemi COVID-19

Abstract

SARS-CoV-2 has caused a global COVID-19 pandemic since late 2019 and the reported cases have not ended until now. One way to overcome the Covid-19 pandemic is to find the main viral protease inhibitor (Mpro) SARS-CoV-2 which is a key enzyme of virus replication. Honey is a bee-derived product that contains various phenolic compounds and has antiviral activity. This study aimed to find candidate Mpro SARS-CoV-2 inhibitors from honey phenolic compounds using molecular docking simulations in a directed manner. A total of 27 test ligands (from honey's phenolic compounds), 4 comparison ligands (from synthetic antiviral compounds), and reference ligands (N3 compound) were screened for their character as drug compounds by Lipinski's rules and for their toxicity by admetSAR. All ligands were docked to the Mpro SARS-CoV-2 receptor code 7BQY using AutoDock Tools 1.5.6 and Autodock

Vina with center of coordinates: X = 10,398; Y = -1,254; Z = 23.473 and grid size: X = 40; Y = 46; Z = 40. Molecular docking simulation produces affinity energy and molecular interactions data. The results showed that the best candidate for Mpro SARS-CoV-2 inhibitor from honey's phenolic compounds was genistein because it complied with all Lipinski rules, was non-toxicogenic, not a carcinogen, had an affinity energy of -7.6 kCal/mol, 80% similarity to the reference ligand N3, and occupies 63,64% of the tether coverage area. The results of this study are expected to be used in further research, both in vitro and in vivo.

Keywords: *honey; phenolic compound; molecular docking; COVID-19 pandemic*

PENDAHULUAN.

SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) merupakan virus yang menimbulkan penyakit COVID-19 yang mulanya tercatat di Wuhan, Republik Rakyat Tiongkok hingga akhirnya masif dan menjadi pandemik global. Kasus penyakit ini di Indonesia masih menunjukkan kurva yang cenderung meningkat sejak tercatat pada awal Maret 2020. Pasien dengan COVID-19, pada awal ditemukannya kasus ini, biasanya didiagnosis sebagai pneumonia akut yang dapat menyebabkan kematian.¹ Virus ini terus bermutasi dan diketahui dapat menginfeksi manusia tanpa gejala. Sampai saat ini, masih belum ditemukan obat, vaksin, atau agen antiviral yang secara spesifik mengobati atau mencegah infeksi SARS-CoV-2 secara efektif. Beberapa vaksin dengan klaim efikasi ~95% telah diproduksi dan didistribusi untuk kondisi darurat, di antaranya adalah buatan Moderna, Pfizer, dan Sinovac. Namun, pandemi COVID-19 belum juga dapat diakhiri. Selain vaksin, upaya lain yang dapat dilakukan untuk mengakhiri pandemi COVID-19 yaitu dengan pencarian obat yang efektif dan spesifik untuk membunuh atau menghambat virus SARS-CoV-2.

Penelitian dan pengembangan obat COVID-19 dapat menarget beberapa bagian penting yang berperan dalam infeksi virus, baik protein struktural maupun fungsional. *Main viral protease* (Mpro) merupakan salah satu enzim kunci dari proses replikasi RNA virus yang menjadi target potensial karena berbeda dengan

protease manusia. Mpro atau 3CLPro merupakan protease SARS-CoV-2 yang bekerja memotong poliprotein (pp) 1a dan 1ab yang saling tumpang tindih menjadi protein fungsional. Enzim kunci replikasi *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) tidak dapat memproses translasi apabila tidak ada pelepasan protein fungsional tersebut.² Oleh karena itu, Mpro merupakan target obat potensial untuk COVID-19.

Senyawa bioaktif masih menjadi kajian menarik dalam dunia medis untuk dimanfaatkan sebagai obat. Penelitian untuk mengungkap potensi bioaktif sebagai obat COVID-19 menjadi salah satu strategi dalam melawan SARS-CoV-2, selain obat kimia yang diketahui memberikan manfaat dalam mengobati beberapa penyakit akibat virus lainnya seperti MERS, SARS, Ebola, HIV, dan hepatitis.³ Senyawa bioaktif banyak ditemukan pada madu, diantaranya golongan fenolik. Madu merupakan produk turunan lebah yang telah lama dikonsumsi manusia untuk menunjang kesehatan sebagai pangan fungsional ataupun obat dan kini semakin bertambah dan berkembang dalam menggantikan produk farmasi kimia sintetis.⁴

Keragaman senyawa bioaktif dari berbagai jenis madu telah dilaporkan dengan dominansi golongan fenolik.⁵⁻¹⁴ Kandungan senyawa fenolik dari konsumsi madu diketahui memegang peranan kunci dalam kesehatan manusia.¹⁵ Penelitian terkini telah mengungkap aktivitas anti-bakteri, anti-virus, dan anti-fungi berspektrum luas dari senyawa bioaktif madu.¹⁶⁻²⁶ Selain itu,

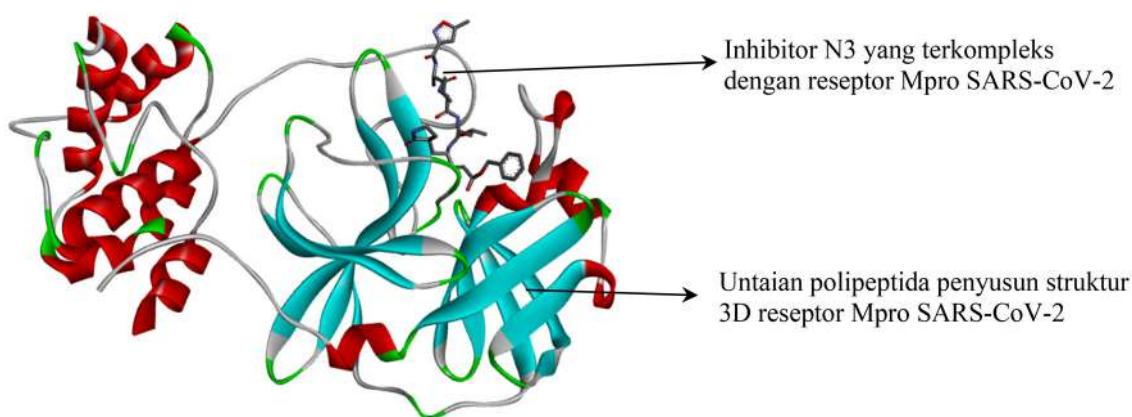
dilaporkan juga adanya aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan anti-kanker.²⁷⁻³⁵ Berbagai aktivitas dari senyawa bioaktif madu tersebut menjadikannya salah satu kandidat obat potensial yang diharapkan efektif mengobati pasien COVID-19.

Studi skrining pencarian obat dari senyawa bioaktif yang efektif dilakukan adalah *in silico* dengan penambatan molekuler. Studi *in silico* diharapkan dapat mempersingkat *trial and error* uji laboratorium secara *in vitro* dan *in vivo* karena posibilitas senyawa bioaktif kandidat obat tersebut telah dipelajari dengan teknik komputasi. Pendekatan penambatan molekuler ini akan memberikan prediksi rekognisi molekuler, baik secara struktur (menemukan situs ikatan) dan energi (prediksi afinitas ikatan). Penambatan molekuler bekerja dengan melihat interaksi antara molekul kecil (ligan) dan protein target (reseptor) yang akan membantu pemahaman dalam merancang dan menemukan obat.³⁶⁻³⁸ Studi ini bertujuan untuk memprediksi aktivitas antiviral dari 27 senyawa fenolik yang umum terdapat dalam madu¹⁵ dengan metode penambatan molekular secara terarah (*targetted*) terhadap reseptor Mpro SARS-CoV-2, sehingga didapatkan kandidat obat potensial COVID-19

berbasis bahan alam.

METODE

Penelitian dilakukan dengan pendekatan *in silico*. Perangkat keras yang digunakan adalah unit komputer merek ASUS tipe A409UA-BV351T. Penelitian ini menggunakan beberapa perangkat lunak, meliputi: AutoDockTools-1.5.6 dan AutoDock Vina,^{39,40} Discovery Studio 2020 Client,⁴¹ LigPlot+ 1.4.5,⁴² Open Babel 2.3.1,^{43,44} dan ACD/ChemSketch 2016.1.⁴⁵ Objek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: (a) reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY (Gambar 1); (b) ligan uji berupa senyawa-senyawa fenolik dari madu (Tabel 1)¹⁵; (c) ligan acuan, yaitu senyawa inhibitor N3 (Tabel 2); dan (d) ligan pembanding yaitu ritonavir, lopinavir, remdesivir, dan favipiravir (Tabel 2). Ligan acuan merupakan senyawa yang terkompleks dengan struktur kristal reseptor 7BQY. Ligan pembanding yang digunakan merupakan senyawa sintetik yang sudah diketahui memiliki aktivitas antivirus.⁴⁶ Ritonavir dan lopinavir merupakan senyawa sintetik yang dilaporkan dapat menghambat viral protease,^{47,48} sedangkan remdesivir dan favipiravir dilaporkan dapat menghambat viral polymerase.^{49,50}



Gambar 1. Konformasi 3D Struktur Kristal Reseptor Mpro SARS-CoV-2 Kode 7BQY

Tabel 1. Struktur Senyawa Fenolik Madu

Nama Ligan	Rumus Molekul	Struktur 2D	Golongan Senyawa	Nama Ligan	Rumus Molekul	Struktur 2D	Golongan Senyawa
Vallinic acid	C ₈ H ₈ O ₄		Asam Fenolat	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		Flavonoid
Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅		Asam Fenolat	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇		Flavonoid
Rutin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇		Flavonoid	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		Flavonoid
Quercetin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆		Flavonoid	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅		Asam Fenolat
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄		Asam Fenolat	Galangin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		Flavonoid
Pinocembrin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄		Flavonoid	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		Asam Fenolat
Pinobanksin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅		Flavonoid	Ellagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈		Flavonoid
p-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃		Asam Fenolat	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂		Asam Fenolat
p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃		Asam Fenolat	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄		Flavonoid
Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈		Flavonoid	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉		Asam Fenolat
Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		Flavonoid	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		Flavonoid
				Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄		Asam Fenolat

Nama Ligan	Rumus Molekul	Struktur 2D	Golongan Senyawa
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		Flavonoid
4-(Dimethyl-amino) benzoic acid	C ₉ H ₁₁ NO ₂		Asam Fenolat
2-Hydroxy-cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃		Asam Fenolat
2-cis, 4-trans Abscisic acid	C ₁₅ H ₂₀ O ₄		Asam Fenolat

Tabel 2. Struktur Ligan Acuan dan Pembanding

Nama Ligan	Rumus Molekul	Struktur 2D
N3	C ₅₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	
Ritonavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	
Lopinavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	
Remdesivir	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	
Favipiravir	C ₈ H ₁₄ FN ₃ O ₂	

Preparasi Reseptor

Struktur kristal reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY^{51,52} dengan format *PDB diunduh pada halaman <https://www.rcsb.org/structure/7BQY>. Struktur kristal reseptor 7BQY terkompleks dengan senyawa inhibitor N3 (N-[(5-Methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanyl-L-valyl-N~1~((1R,2Z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-{(3R)-2-oxopyrrolidin3-yl}methyl}but-2-enyl)-L-leucinamide). Struktur reseptor dengan format *PDB dipreparasi dengan perangkat lunak Discovery Studio 2020 Client dan AutoDock Tools 1.5.6. Perangkat lunak Discovery Studio 2020 Client digunakan untuk mendapatkan struktur murni dengan menghilangkan komponen air, heteroatom, dan ligan-ligan yang terkompleks dengan reseptor. Selanjutnya, struktur murni reseptor disimpan dengan format *PDB. Struktur murni reseptor kemudian dibuka dengan AutoDock Tools 1.5.6 untuk ditambahkan atom hidrogen pada bagian polarnya dan dihitung muatan Gasteiger-nya. Setelah itu, reseptor disimpan dalam format *PDBQT untuk digunakan dalam simulasi penambatan molekuler.

Preparasi reseptor juga dilakukan untuk menentukan stabilitas struktur kristal reseptor melalui nilai resolusi dan plot Ramachandran. Nilai resolusi struktur kristal reseptor didapatkan dari situs <https://www.rcsb.org/>, sedangkan plot Ramachandran didapatkan melalui aplikasi MolProbity⁵³ yang dapat diakses pada <http://molprobity.biochem.duke.edu/>. Selain itu, preparasi reseptor juga dilakukan untuk menentukan area cakupan penambatan berdasarkan struktur sekunder protein yang dapat diakses pada <https://www.rcsb.org/sequence/7BQY>. Area cakupan penambatan yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan residu-residu asam amino yang berperan dalam membentuk sisi aktif (*active site*), situs pengikatan (*binding site*), dan ikatan kovalen (*covalent bonding*). Residu-residu yang terlibat dalam area ini digunakan untuk menentukan persentase area cakupan penambatan ligan yang diuji.

Preparasi Ligan

Ligan uji yang digunakan meliputi 27 senyawa fenolik yang berasal dari madu berdasarkan studi reviu yang dilakukan oleh Cianciosi dkk.¹⁵ Selain itu juga digunakan ligan acuan senyawa inhibitor N3 dan ligan pembanding sebanyak empat senyawa. Semua ligan dievaluasi kemiripan karakternya dengan senyawa obat menggunakan *Lipinski Rule of Five* secara simulasi pada halaman <http://scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>.⁵⁴ Selain itu, evaluasi karakter toksisitas ligan juga diprediksi menggunakan perangkat admetSAR yang dapat diakses pada halaman <http://lmmdecust.edu.cn/admetsar1/predict/>.⁵⁵

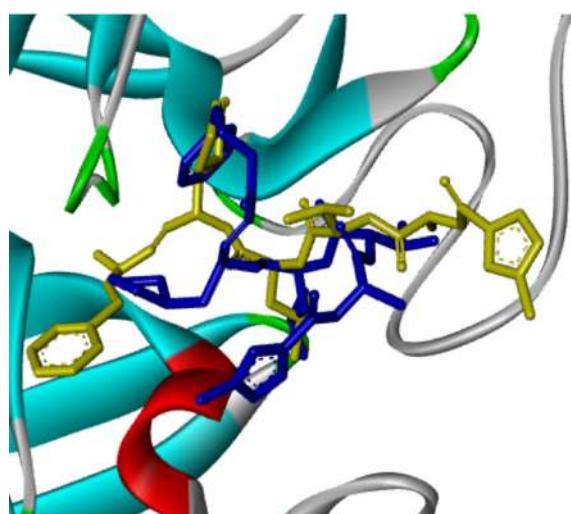
Semua ligan yang digunakan dalam penelitian ini direkonstruksi menggunakan perangkat lunak ACD/ChemSketch 2016.1 dan disimpan dalam format *MOL. Selanjutnya, struktur ini dibuka menggunakan perangkat lunak Discovery Studio 2020 Client dan disimpan dalam format *PDB. Setelah itu, struktur ligan dalam format *PDB dibuka menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 dan disimpan dalam format *PDBQT untuk digunakan dalam simulasi *molecular docking*. Ligan dengan format *MOL juga dikonversi ke dalam format *SMILE menggunakan perangkat Open Babel untuk digunakan pada perangkat admetSAR dalam memprediksi nilai toksisitas ligan.

Simulasi Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler dilakukan dengan pendekatan penambatan terarah (*targeted docking*) menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools-1.5.6 dan AutoDock Vina. Simulasi menggunakan reseptor dan ligan dengan format *PDBQT yang sudah dipreparasi. Ukuran kisi (*grid size*) dan pusat koordinat penambatan ditentukan berdasarkan posisi ligan acuan N3 yang terkompleks pada struktur kristal reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY. Pusat koordinat meliputi X = 10,398; Y = -1,254; dan Z = 23,473 dengan ukuran kisi meliputi X= 40, Y = 46, dan Z = 40. Penelitian ini menggunakan *exhaustiveness* = 64 dan *num modes* = 20 untuk meningkatkan

akurasi penambatan molekuler.

Simulasi diawali dengan tahapan validasi perangkat AutoDock Tools-1.5.6 dan AutoDock Vina dengan cara menambatkan ulang (*redocking*) ligan acuan N3 ke reseptor Mpro SARS-CoV-2. Reseptor dan perangkat simulasi dapat digunakan untuk simulasi penambatan molekuler jika ligan acuan menempati kembali area penambatan atau memiliki nilai RMSD (*root mean square of deviation*) kurang dari 2.5 Å setelah proses *redocking*.⁵⁶ Hasil validasi menunjukkan bahwa posisi N3 yang ditambatkan ulang dapat kembali ke posisi semula (Gambar 2), sehingga perangkat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dinyatakan baik dan dapat digunakan untuk simulasi penambatan molekuler.



Gambar 2. Visualisasi 3D Hasil Validasi Perangkat Penambatan Molekuler: Posisi Awal N3 (Kuning) dan Posisi Penambatan Ulang N3 (Biru Tua)

Hasil simulasi penambatan molekuler akan menghasilkan data berupa energi afinitas ikatan (ΔG) dan area penambatan ligan dalam format *PDBQT. Area penambatan kemudian divisualisasi bentuk 3D-nya menggunakan perangkat lunak Discovery Studio 2020 Client. Selain itu, berdasarkan area penambatan terbaik dianalisis ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terbentuk antara ligan dan reseptor menggunakan perangkat lunak LigPlot+ 1.4.5.

HASIL

Stabilitas dan Struktur Reseptor

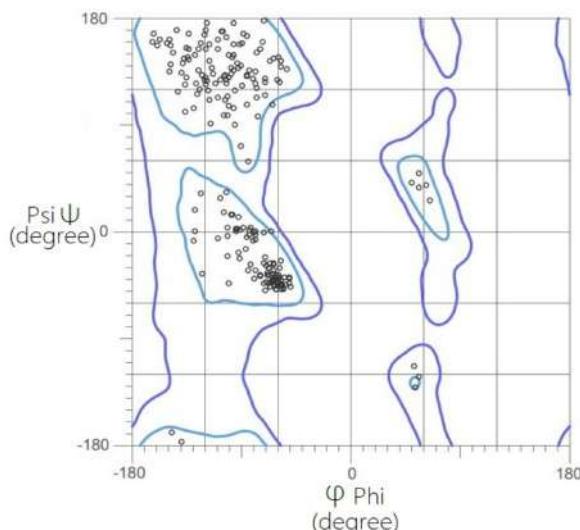
Stabilitas struktur kristal reseptor dapat ditentukan berdasarkan resolusi struktur kristal dan plot Ramachandran. Nilai resolusi yang kecil menunjukkan bahwa struktur kristal pada PDB memiliki struktur resolusi yang tinggi (*high resolution structure*) karena nilai keadaan atom-atom penyusun struktur kristal mendekati keadaan yang sebenarnya. Lu dkk.⁵⁷ menyatakan bahwa struktur kristal reseptor dinyatakan stabil jika memiliki resolusi kurang dari 2,5 Å. Struktur kristal reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY yang digunakan dalam penelitian ini memiliki resolusi 1,7 Å, sehingga dapat dinyatakan bahwa struktur kristal 7BQY stabil dan memiliki struktur resolusi yang tinggi.

Stabilitas struktur reseptor 7BQY juga dianalisis menggunakan plot Ramachandran (Plot Ramachandran 7BQY dapat diakses pada <http://molprobity.biochem.duke.edu/> dengan memasukkan kode PDB: 7BQY). Plot Ramachandran merupakan alat validasi struktur protein dengan akurasi yang tinggi, baik secara eksperimental maupun komputasi yang sudah lama digunakan.⁵⁸ Lokasi residu asam amino dari struktur protein pada plot Ramachandran ditentukan oleh sudut $\Phi\psi$ (sudut yang terbentuk pada sekitar ikatan N-C α) dan $\Psi\psi$ (sudut yang terbentuk pada sekitar ikatan C α -C) dari setiap residu asam amino.⁵⁹ Semakin banyak residu asam amino yang menempati daerah yang diijinkan (*allowed region*) menunjukkan bahwa struktur kristal protein semakin mendekati bentuk aslinya.

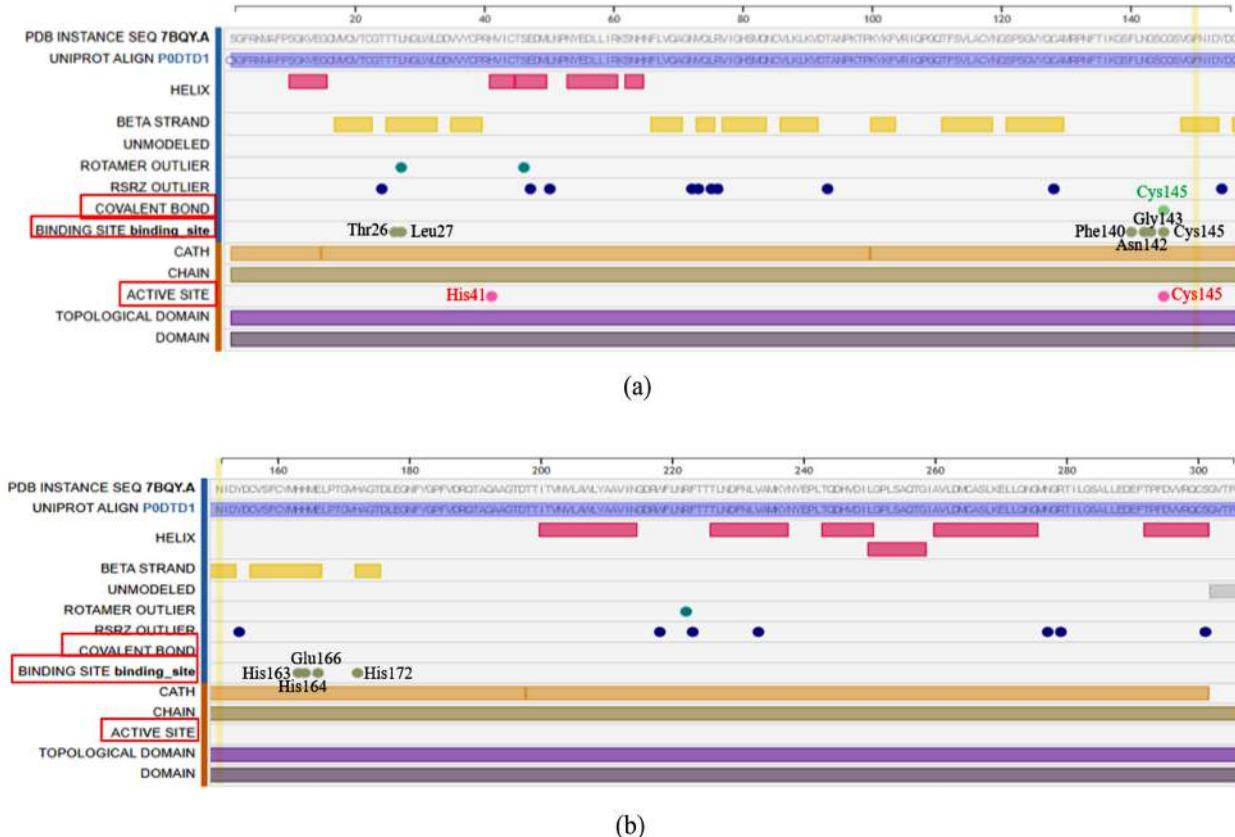
Residu asam amino reseptor 7BQY berada di wilayah yang disukai sebesar 98,3% (*favorable region*), 100% pada wilayah yang diizinkan (*allowed region*), dan 0% residu asam amino menempati area yang tidak diijinkan (*disallowed region*) (Gambar 3). Hal ini menandakan semua residu asam amino pada reseptor 7BQY dapat membentuk konformasi struktur protein yang stabil dan menyerupai konformasi protein yang sebenarnya. Pendekatan studi *in silico* memerlukan struktur protein dengan

konformasi yang semirip mungkin dengan keadaan sebenarnya karena akan menghasilkan pemodelan yang juga diharapkan mendekati keadaan sebenarnya.

Struktur sekunder protein Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY yang didapatkan dari laman <https://www.rcsb.org/sequence/7BQY> menunjukkan area *active site*, *binding site*, dan *covalent bonding*. Area sisi aktif meliputi residu His41 dan Cys145; area *binding site* meliputi residu Thr26, Leu27, Phe140, Asn142, Gly143, Cys145, His163, His164, Glu166, His172; sedangkan area *covalent bonding* meliputi residu Cys145 (Gambar 4). Residu asam amino yang melingkupi area sisi aktif, *binding site*, dan *covalent bonding* berpotensi untuk memberikan pengaruh fungsional dari reseptor saat berikatan dengan ligan. Penelitian ini menggunakan 11 residu asam amino tersebut untuk menentukan persentase area cakupan inhibisi untuk mengevaluasi area penambatan ligan pada reseptor. Semakin besar nilai persentase area cakupan penambatan menunjukkan potensi inhibisi ligan yang besar terhadap reseptor.



Gambar 3. Plot Ramachandran Mpro SARS-CoV-2 Kode 7BQY: Bagian di Dalam Garis Biru Tua Merupakan Wilayah yang Disukai dan Bagian di Dalam Garis Biru Muda Merupakan Wilayah yang Diperbolehkan



Gambar 4. Sekuens Asam Amino Penyusun Reseptor 7BQY:
(a) Residu Asam Amino 1-150 dan (b) Residu Asam Amino 151-306

Prediksi Kemiripan Ligan dengan Senyawa Obat

Analisis aturan 5 Lipinski (*Lipinski Rule of Five* (Ro5)) digunakan untuk memprediksi bioavailabilitas (kemampuan terserap tubuh) molekul ligan yang diuji sebagai senyawa obat. Kandidat senyawa obat dapat diberikan melalui oral dan dikatakan baik apabila hanya melanggar maksimal 1 kriteria dari Ro5, yaitu massa molar (*molecular weight (MW)*) < 500 , *H-bond donors (HBD)* < 5 , *H-bond acceptors (HBA)* < 10 , dan $\text{Log P} < 5$.⁵⁴ Kriteria lainnya yang mendukung aturan Lipinski tersebut adalah nilai refraktivitas molar antara 40-130.⁶⁰

Hasil prediksi analisis Ro5 ligan uji dan ligan pembanding dapat dilihat pada Tabel 3. Sebanyak 26 dari 27 (~96%) senyawa fenolik madu diprediksi memiliki kemiripan dengan senyawa obat dengan baik, yaitu maksimal

melanggar 1 kriteria Ro5 (memenuhi 4-5 kriteria yang diuji). Hanya senyawa rutin yang tidak memenuhi Ro5. Adapun pada ligan pembanding, hanya 1 ligan pembanding yang diprediksi memiliki kemiripan dengan senyawa obat dengan baik, yaitu favipiravir (memenuhi 4 dari 5 kriteria yang diuji). Semua ligan yang dikategorikan memiliki kemiripan yang baik dengan senyawa obat dapat diberikan secara oral dan merupakan kandidat obat yang baik.

Prediksi Toksisitas Ligan

Toksisitas merupakan salah satu kriteria yang perlu dicermati agar diperoleh kandidat obat yang aman digunakan. Beberapa parameter terkait toksisitas diprediksi pada studi ini menggunakan admetSAR dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4. Karakter ADMET (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, toksisitas) suatu ligan sebagai kandidat obat dapat menjadi gambaran

Tabel 3. Analisis Lipinski Rule of Five Senyawa Fenolik Madu dan Ligan Pembanding

Ligan	MW (g/mol)	HBD	HBA	Log P	Refraktifitas Molar	Hasil
Ritonavir	720,94	0	10	0	0	2/5
Lopinavir	628,80	0	9	-0,19813	147,00	3/5
Remdesivir	602,58	0	13	1,99	122,59	3/5
Favipiravir	157,10	0	5	-0,81	29,59	4/5
Vallinic acid	168,15	0	4	-1,48	32,65	4/5
Syringic acid	198,17	0	5	-0,94	36,23	4/5
Rutin	512,53	0	16	-3,41	116,81	3/5
Quercetin	302,24	0	7	-1,95	63,97	5/5
Protocatechic acid	154,12	0	4	-2,53	29,93	4/5
Pinocembrin	256,25	0	4	-0,40	56,85	5/5
Pinobanksin	272,25	0	5	-0,68	58,51	5/5
p-Hydroxybenzoic acid	138,12	0	3	-2,10	28,81	4/5
p-Coumaric acid	164,16	0	3	-2,10	36,59	4/5
Myricetin	318,25	0	8	-2,61	65,20	5/5
Luteolin	286,24	0	6	-1,66	62,32	5/5
Kaempferol	286,24	0	6	-1,51	62,86	5/5
Isorhamnetin	316,26	0	7	-1,05	67,93	5/5
Genistein	270,24	0	5	-1,05	62,42	5/5
Gallic acid	170,12	0	5	-2,96	31,05	4/5
Galangin	270,24	0	5	-0,68	58,51	5/5
Ferulic acid	194,18	0	4	-1,48	40,43	5/5
Ellagic acid	302,19	0	8	-1,94	60,53	5/5
Cinnamic acid	148,16	0	2	-1,27	32,24	4/5
Chrysin	254,24	0	4	-0,40	56,85	5/5
Chlorogenic acid	354,31	0	9	-4,20	70,52	5/5
Catechin	290,27	0	6	-1,71	64,56	5/5
Caffeic acid	180,16	0	4	-2,53	37,70	4/5
Apigenin	270,24	0	5	-1,00	61,09	5/5
4-(Dimethylamino) benzoic acid	165,19	0	2	-1,43	33,15	4/5
2-Hydroxycinnamic acid	164,16	0	3	-2,02	36,86	4/5
2-cis, 4-trans Abscisic acid	264,32	0	4	-0,95	57,17	5/5

Keterangan:

MW : Molecular weight/ bobot molekul

HBD: hydrogen-bond donor/ donor ikatan hidrogen

HBA: hydrogen-bond acceptor/penerima ikatan hidrogen

Log P: octanol–water partition coefficient/koefisien parsial oktanol-air

untuk memprediksi dosis terapeutik yang dapat digunakan.⁶¹

Sifat inhibisi *human ether-a-go-go-related gene* (hERG) dari semua ligan yang diuji, baik dari senyawa fenolik madu maupun ligan pembanding (senyawa obat) menunjukkan kategori inhibitor lemah terhadap hERG. Hal ini menandakan interaksi kandidat obat (ligan) tersebut dengan hERG posibilitasnya rendah, sehingga diprediksi tidak membahayakan ritme dan elektrifikasi jantung.⁶² Kategori inhibitor lemah merupakan kategori inhibisi terendah dengan IC₅₀ ≥ 10 μM.⁶³

Toksitas AMES merupakan parameter identifikasi potensi efek karsinogen genotoksik yang secara *in vitro* dilakukan pada bakteri *Salmonella typhimurium*.⁶⁴ Semua ligan yang diuji pada penelitian ini termasuk kategori tidak toksik. Sifat karsinogen pada prediksi toksitas admetSAR juga dikelompokkan berdasarkan kelas dan kategorinya. Karsinogenitas semua ligan uji termasuk kelas yang tidak berbahaya (*non-required*) dan tidak karsinogen.

Toksitas oral akut dikategorikan menjadi 4, yaitu kategori I (toksik dengan LD₅₀ < 50 mg/kg BB), kategori II (*warning*, cukup toksik dengan 50 < LD₅₀ < 500 mg/kg BB), kategori III (*caution*, sedikit toksik dengan 500 > LD₅₀ > 5,000 mg/kg BB), dan kategori IV (*none required*, tidak toksik dengan LD₅₀ > 5,000 mg/kg BB).⁶⁵ Kategori I dan II dikelompokkan sebagai kelompok toksik sedangkan kategori III dan IV dapat dikelompokkan kelompok non-toksik.⁶¹ Sebanyak 9 senyawa fenolik madu bersifat toksik dengan kategori II, yaitu *syringic acid*, *quercetin*, *pinocembrin*, *pinobanksin*, *myricetin*, *luteolin*, *kaempferol*, *galangin*, dan *ellagic acid*. Senyawa fenolik madu lainnya sebanyak 18 termasuk dalam kelompok non-toksik, baik dalam kategori III dan IV. Semua ligan pembanding senyawa antiviral sintetik bersifak non-toksik dan masuk dalam kategori III. Data prediksi toksitas LD₅₀ dari perangkat admetSAR dapat digunakan sebagai acuan dalam pertimbangan penentuan dosis pada penelitian *in vivo*.

Energi Afinitas dan Interaksi Molekuler

Data energi afinitas (ΔG) didapatkan setelah simulasi penambatan molekuler selesai. Energi afinitas menunjukkan kekuatan ikatan yang terbentuk dari interaksi ligan dan reseptor. Semakin kecil (negatif) nilainya menunjukkan bahwa ligan semakin berpotensi untuk membentuk ikatan yang kuat dengan reseptor.

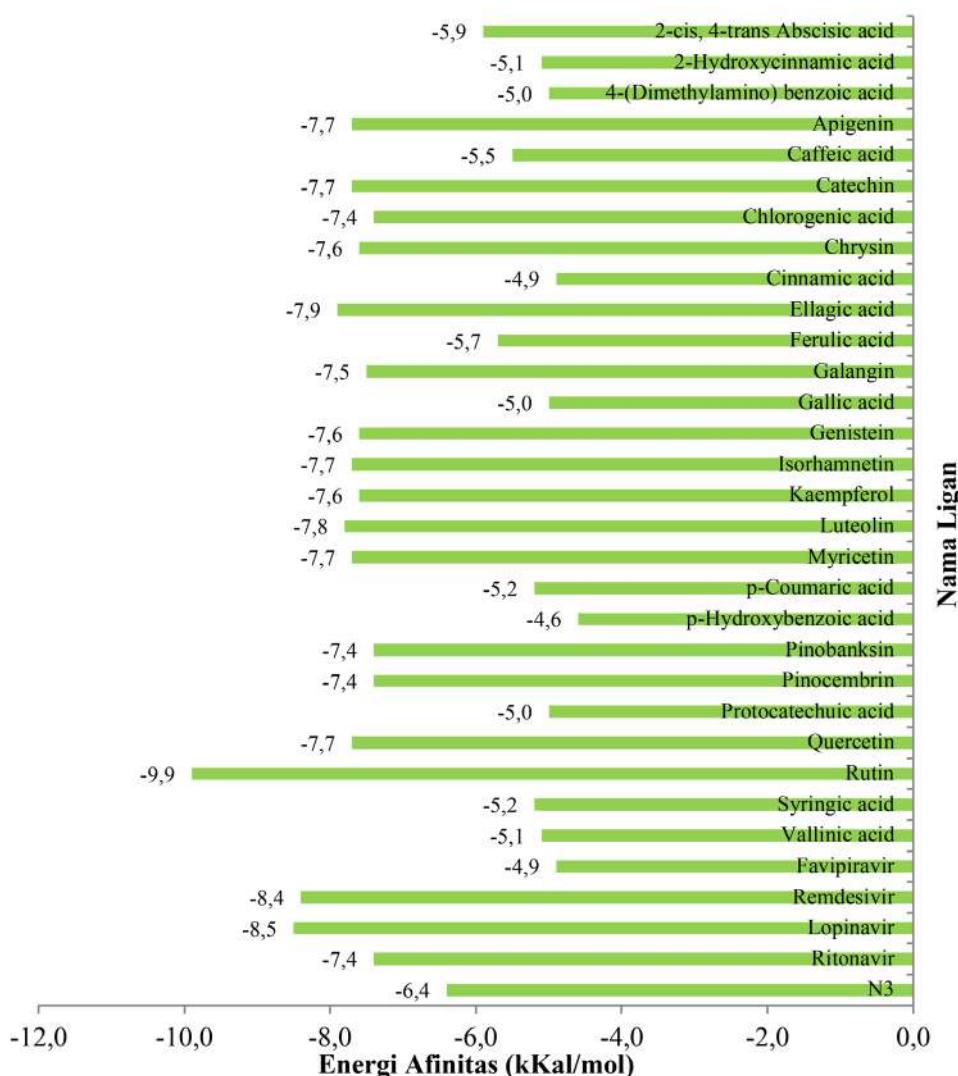
Ligan acuan N3 memiliki energi afinitas sebesar -6,4 kKal/mol. Sebanyak 15 dari 27 (~55%) senyawa fenolik madu memiliki nilai afinitas energi yang lebih rendah dari ligan acuan, yaitu *rutin*, *ellagic acid*, *luteolin*, *apigenin*, *catechin*, *isorhamnetin*, *myricetin*, *quercetin*, *chrysins*, *ganistein*, *kaempferol*, *galangin*, *chlorogenic acid*, *pinobanksin*, dan *pinocembrin*. Hal ini menunjukkan bahwa ke-15 senyawa fenolik tersebut diprediksi dapat membentuk ikatan yang kuat dengan reseptor Mpro SARS-CoV-2. Adapun ligan pembanding senyawa antiviral sintetik menunjukkan 3 dari 4 memiliki energi afinitas yang lebih rendah dari N3, yaitu ritonavir, lopinavir, dan remdesivir. Potensi ligan terbesar untuk terikat pada Mpro ini adalah senyawa rutin dari madu dengan nilai energi afinitas terendah, yaitu -9,9 kKal/mol (Gambar 5).

Selain kuatnya ikatan yang ditandai dengan semakin kecilnya energi afinitas, ketepatan ikatan antara reseptor dan ligan uji dibandingkan dengan ligan acuan inhibitor N3. Kesamaan dan cakupan area penambatan ikatan residu asam ammino yang mendekati hingga lebih tinggi dari inhibitor N3 diprediksi sebagai inhibitor potensial.⁶⁶ Berdasarkan analisis kemiripan dengan ligan acuan N3 dan persentasi area cakupan, sebanyak 2 dari 27 senyawa fenolik madu memiliki persentasi kemiripan dengan N3 dan persentasi area cakupan lebih dari 60% sehingga diprediksi berpotensi untuk menginhibisi reseptor 7BQY secara kuat dan tepat. Kedua senyawa tersebut adalah rutin dan genistein. Sementara itu, 3 dari 4 ligan pembanding senyawa antiviral sintetik memiliki persentasi kemiripan dengan N3 dan cakupan inhibisi lebih dari 60%, yaitu remdesivir, lopinavir, dan ritonavir (Tabel 5).

Tabel 4. Analisis Toksisitas dengan AdmetSAR

Ligan	hERG	AMES Toxicity	Karsinogenitas		Toksisitas Oral Akut/Rat LD50	
			Kelas (Danger/Warning/ Non-Required)	Kategori (Karsinogen/Tidak karsinogen)	Kategori	Dosis (mol/kg)
Ritonavir	inhibitor lemah (0,9774)	tidak toksik (0,7378)	non-required (0,5824)	tidak karsinogen (0,8664)	III (0,5962)	2,6154
Lopinavir	inhibitor lemah (0,8605)	tidak toksik (0,8049)	non-required (0,6710)	tidak karsinogen (0,7865)	III (0,6281)	2,2503
Remdesivir	inhibitor lemah (0,9295)	tidak toksik (0,6158)	non-required (0,5361)	tidak karsinogen (0,8293)	III (0,5357)	2,7169
Favipiravir	inhibitor lemah (0,9955)	tidak toksik (0,8216)	non-required (0,7452)	tidak karsinogen (0,9086)	III (0,5428)	2,1563
Vallinic acid	inhibitor lemah (0,9811)	tidak toksik (0,9419)	non-required (0,6294)	tidak karsinogen (0,9046)	III (0,4923)	1,871
Syringic acid	inhibitor lemah (0,9858)	tidak toksik (0,9342)	non-required (0,6294)	tidak karsinogen (0,7159)	II (0,4765)	2,5353
Rutin	inhibitor lemah (0,9402)	tidak toksik (0,5448)	non-required (0,6139)	tidak karsinogen (0,9630)	III (0,5196)	2,6138
Quercetin	inhibitor lemah (0,9781)	tidak toksik (0,7220)	non-required (0,6750)	tidak karsinogen (0,9450)	II (0,7348)	3,0002
Protocatechuic acid	inhibitor lemah (0,9818)	tidak toksik (0,9326)	non-required (0,6219)	tidak karsinogen (0,9154)	III (0,5059)	1,6414
Pinocembrin	inhibitor lemah (0,9640)	tidak toksik (0,9133)	non-required (0,6152)	tidak karsinogen (0,9364)	II (0,3682)	3,5110
Pinobanksin	inhibitor lemah (0,9795)	tidak toksik (0,9133)	non-required (0,6985)	tidak karsinogen (0,9363)	II (0,6238)	3,0825
p-Hydroxybenzoic acid	inhibitor lemah (0,9617)	tidak toksik (0,9826)	non-required (0,6300)	tidak karsinogen (0,8226)	III (0,5472)	1,3983
p-Coumaric acid	inhibitor lemah (0,9502)	tidak toksik (0,9521)	non-required (0,6034)	tidak karsinogen (0,8248)	III (0,4898)	1,3698
Myricetin	inhibitor lemah (0,9781)	tidak toksik (0,8161)	non-required (0,6750)	tidak karsinogen (0,9450)	II (0,7348)	3,02
Luteolin	inhibitor lemah (0,9781)	tidak toksik (0,8161)	non-required (0,6750)	tidak karsinogen (0,9450)	II (0,7348)	3,02
Kaempferol	inhibitor lemah (0,9795)	tidak toksik (0,9133)	non-required (0,6985)	tidak karsinogen (0,9363)	II (0,6238)	3,0825
Isorhamnetin	inhibitor lemah (0,9772)	tidak toksik (0,8494)	non-required (0,6176)	tidak karsinogen (0,9423)	III (0,7362)	2,7192
Genistein	inhibitor lemah (0,9569)	tidak toksik (0,9638)	non-required (0,7003)	tidak karsinogen (0,9276)	III (0,5830)	3,2988
Gallic acid	inhibitor lemah (0,9821)	tidak toksik (0,9146)	non-required (0,7405)	tidak karsinogen (0,9177)	III (0,6904)	1,867
Galangin	inhibitor lemah (0,9795)	tidak toksik (0,9133)	non-required (0,6985)	tidak karsinogen (0,9363)	II (0,6238)	3,0825
Ferulic acid	inhibitor lemah (0,9754)	tidak toksik (0,9132)	non-required (0,5903)	tidak karsinogen (0,9076)	IV (0,6265)	1,4314
Ellagic acid	inhibitor lemah (0,9721)	tidak toksik (0,9127)	non-required (0,6954)	tidak karsinogen (0,9582)	II (0,6020)	2,6213
Cinnamic acid	inhibitor lemah (0,9620)	tidak toksik (0,9722)	non-required (0,7458)	tidak karsinogen (0,5927)	III (0,8487)	1,7416
Chrysin	inhibitor lemah (0,9559)	tidak toksik (0,8906)	non-required (0,6044)	tidak karsinogen (0,9181)	III (0,7012)	2,6983
Chlorogenic acid	inhibitor lemah (0,9862)	tidak toksik (0,9132)	non-required (0,6128)	tidak karsinogen (0,9341)	III (0,7775)	2,5685
Catechin	inhibitor lemah (0,9666)	tidak toksik (0,7658)	non-required (0,5825)	tidak karsinogen (0,9539)	IV (0,6433)	1,87
Caffeic acid	inhibitor lemah (0,9763)	tidak toksik (0,9132)	non-required (0,5848)	tidak karsinogen (0,9183)	IV (0,5588)	1,4041
Apigenin	inhibitor lemah (0,9559)	tidak toksik (0,8906)	non-required (0,6044)	tidak karsinogen (0,9181)	III (0,7012)	2,6983
4-(Dimethylamino) benzoic acid	inhibitor lemah (0,9713)	tidak toksik (0,8278)	non-required (0,5503)	tidak karsinogen (0,5671)	III (0,7184)	2,1521
Hydroxycinnamic acid	inhibitor lemah (0,9513)	tidak toksik (0,9217)	non-required (0,6508)	tidak karsinogen (0,8663)	III (0,5872)	1,6615
2-cis, 4-trans Abscisic acid	inhibitor lemah (0,9832)	tidak toksik (0,8598)	non-required (0,5812)	tidak karsinogen (0,8479)	III (0,6395)	2,568

Catatan: angka di dalam tanda kurung () menunjukkan nilai probabilitas dengan rentang nilai 0 sampai 1



Gambar 5. Energi Afinitas Ikatan Ligan dan Reseptor Mpro SARS-CoV-2 Kode 7BQY

Tabel 5. Interaksi Molekuler Ligan dengan Reseptor Mpro SARS-CoV-2 7BQY

Ligan	Interaksi Molekul		Kemiripan dengan N3 (%)	Cakupan Area Penambatan (Sisi Aktif, Binding Site, dan Ikatan Kovalen) (%)
	Ikatan hidrogen	Interaksi hidrofobik		
N3	Gly143, Glu166, Gln189	Cys145, Met165, His164, His41, Tyr54, Asp187, Thr190, Ser46, Leu141, His163, Asn142, Phe140	100,00	72,73
Ritonavir	Gln189	Gln192, Thr190, Glu166, His163, Phe140, Leu141, Met165, Leu167, Asp187, Arg188, His41, His164, Met49, Leu27, Gly143, Thr26, Asn119, Thr25, Thr24	66,67	72,73
Lopinavir	0	Met165, Gln189, Pro168, Thr190, Leu167, Glu166, Arg188, Asp187, His41, His164, Leu141, Ser144, Gly143, Met49, Thr26, Thr25, Leu27, Phe140, His163	73,33	72,73
Remdesivir	Gly143, Ser144, Cys145, His163	His164, Gln189, Asp187, Met165, Leu141, Glu166, Asn142, Thr26, Met149, Thr25, Thr24, His41, Tyr52, Arg188, Tyr54	73,33	63,64
Favipiravir	His41, Tyr54	Asp187, Gln189, Arg188, His164, Met165	40,00	18,18

Ligan	Interaksi Molekul		Kemiripan dengan N3 (%)	Cakupan Area Penambatan (Sisi Aktif, Binding Site, dan ikatan Kovalen) (%)
	Ikatan hidrogen	Interaksi hidrofobik		
Vallinic acid	Glu166	Met165, Gln189, Arg188, His164, His41, Asp187	40,00	27,27
Syringic acid	Tyr54	Met49, Arg188, Met165, His164, Cys145, His41, Gln189, Asp187	46,67	27,27
Rutin	Glu166, Cys145, Gly143, Thr26	His41, Asp187, Gln189, Met165, Arg188, His164, Leu141, Asn142, Met49, Thr25, Leu27	66,67	72,73
Quercetin	Gln192	His164, His41, Asp187, Arg188, Gln189, Pro168, Leu167, Ala191, Glu166, Thr190, Met165	46,67	27,27
Protocatechuic acid	Glu166	His164, Arg188, Gln189, Met165, His41, Asp187	40,00	27,27
Pinocembrin	0	His41, Gln189, Met165, Glu166, Thr190, Pro168, Arg188, Leu167, Asp187, His164	46,67	27,27
Pinobanksin	Glu166, Tyr54	Asp187, His41, His164, Met165, Leu167, Thr190, Gln189, Arg188	53,33	27,27
p-Hydroxybenzoic acid	Glu166	Met165, His164, His41, Asp187, Arg188, Gln189	40,00	27,27
p-Coumaric acid	His41	Glu166, Met165, Asp187, Gln189, Arg188	33,33	18,18
Myricetin	0	His41, His164, Met165, Glu166, Thr190, Gln192, Leu167, Gln189, Pro168, Arg188, Asp187	46,67	27,27
Luteolin	Gln192	Thr190, Ala191, Pro168, Leu167, His164, His41, Arg187, Met165, Gln189, Arg188, Glu166	46,67	27,27
Kaempferol	Gln192	His41, His164, Met165, Glu166, Leu167, Ala191, Thr190, Pro168, Gln189, Arg188, Asp187	46,67	27,27
Isorhamnetin	Gln192	Glu166, His164, Gln189, Leu167, Thr190, Pro168, Ala191, Met165, Asp187, Arg188, His41	46,67	27,27
Genistein	Tyr54	Arg188, Gln189, His164, Glu166, Met165, Leu141, Phe140, Asn142, His163, Cys145, Asp187, His41	80,00	63,64
Gallic acid	His41	Asp187, Arg188, Met165, Gln189, His164	33,33	18,18
Galangin	0	His164, Met165, Glu166, Pro168, Leu167, Thr190, Gln189, Arg188, Asp187, His41	46,67	27,27
Ferulic acid	0	His164, Tyr54, Gln189, Glu166, Leu167, Met165, Thr190, Gln192, Arg188, His41, Asp187	53,33	27,27
Ellagic acid	Gly143, His41	Cys145, Asn142, Arg188, Gln189, Met165, His164	46,67	45,45
Cinnamic acid	0	Glu166, Gln189, Met165, Asp187, His41, Arg188	33,33	18,18
Chrysin	0	His41, His164, Gln189, Glu166, Leu167, Pro168, Gln192, Thr190, Met165, Arg188, Asp187	46,67	27,27
Chlorogenic acid	His163, Ser144, Cys145, Glu166	Asp187, Arg188, Gln189, Met165, His41, Leu141, Asn142	60,00	45,45
Catechin	Tyr54, Glu166	Asp187, Arg188, Gln189, Pro168, Thr190, Leu167, Met165, His164, His41	53,33	27,27
Caffeic acid	0	His41, His164, Met165, Gln192, Glu166, Thr190, Gln189, Arg188	40,00	27,27
Apigenin	Tyr54, His163	Leu141, Glu166, Cys145, Phe140, Met49, Met165, His164, Asp187, Arg188, Gln189, His41	66,67	54,55
4-(Dimethylamino) benzoic acid	His41	His164, Met165, Glu166, Arg188, Asp187, Gln189	40,00	27,27
2-Hydroxycinnamic acid	His41, Tyr 54	Glu166, Gln189, Arg188, Met165, Asp187	40,00	18,18
2-cis, 4-trans Abscisic acid	Glu166	Gln189, Met49, His41, His164, Arg188, Met165, Asn142, Asp187	46,67	36,36

PEMBAHASAN

Preparasi terhadap reseptor dan ligan yang digunakan dalam simulasi penambatan molekuler penting dilakukan untuk mendapatkan hasil simulasi yang baik dan mendekati keadaan yang sebenarnya. Preparasi meliputi persiapan struktur reseptor dan ligan menjadi format *PDBQT, analisis stabilitas reseptor, skrining Ro5 ligan, dan prediksi toksitas ligan. Preparasi format *PDBQT harus dilakukan karena hanya dalam format ini simulasi penambatan molekuler menggunakan perangkat AutoDockTools 1.5.6 dan AutoDock Vina dapat dijalankan.

Struktur kristal reseptor Mpro SARS-CoV-2 7BQY beresolusi 1.7 Å, lebih kecil dibandingkan 6LU7 (2.16 Å) yang ditemukan lebih awal oleh tim peneliti yang sama.⁵² Hal ini menunjukkan bahwa struktur kristal 7BQY memiliki kemiripan lebih tinggi terhadap struktur *native*-nya dibandingkan dengan reseptor 6LU7. Reseptor 7BQY memiliki seluruh residu asam amino yang berada di area yang diizinkan berdasarkan plot Ramachandran, sehingga strukturnya dapat dinyatakan stabil.⁶⁷ Dua indikator ini menunjukkan bahwa reseptor 7BQY memiliki stabilitas yang baik dan dapat digunakan dalam simulasi penambatan molekuler untuk mendapatkan hasil simulasi yang presisi dan mendekati keadaan yang sebenarnya.

Ligan-ligan yang digunakan dalam penelitian ini diskirining kemiripannya dengan karakter obat menggunakan aturan Lipinski Ro5 dan diprediksi toksitasnya menggunakan perangkat admetSAR. Sebanyak 26 dari 27 senyawa fenolik madu yang digunakan memenuhi Ro5, sehingga 26 senyawa fenolik madu tersebut dapat disarankan untuk intervensi secara oral. Hanya senyawa rutin yang tidak memenuhi Ro5, sehingga tidak disarankan untuk intervensi secara oral. Hanya 1 dari 4 senyawa antiviral sintetik yang memenuhi Ro5 yaitu favipiravir, sehingga dapat disarankan untuk diberikan intervensi secara oral. Senyawa antiviral lainnya, yaitu remdesivir, lopinavir, dan ritonavir tidak

memenuhi Ro5, sehingga disarankan untuk intervensi selain oral. Selain skrining Ro5, ligan-ligan yang digunakan juga diprediksi karakter toksitasnya dengan perangkat admetSAR. Seluruh ligan yang digunakan dalam penelitian ini (27 senyawa fenolik madu dan 4 senyawa antiviral sintetik) diprediksi aman terhadap kerja jantung (inhibitor lemah hERG), tidak toksik, dan bukan karsinogen. Semua ligan-ligan yang digunakan dalam penelitian ini diprediksi aman untuk digunakan.

Penambatan molekuler telah berhasil dilakukan menggunakan 27 senyawa fenolik dari madu dan 4 senyawa antiviral sintetik sebagai ligan pembanding. Energi afinitas dengan nilai yang lebih negatif dari ligan acuan N3 menunjukkan memiliki ikatan yang lebih kuat dengan reseptor sekaligus memiliki potensi inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ligan acuan N3. Ligan acuan N3 memiliki energi afinitas sebesar -6,4 kKal/mol yang nilainya tidak lebih negatif dibandingkan 15 senyawa fenolik madu (*rutin, ellagic acid, luteolin, apigenin, catechin,isorhamnetin, myricetin, quercetin, chrysins, galangin, chlorogenic acid, pinobanksin, dan pinocembrin*) dan 3 senyawa antiviral sintetik (ritonavir, lopinavir, dan remdesivir). Ligan-ligan dengan energi afinitas lebih negatif dari N3 menunjukkan ikatan dengan reseptor 7BQY yang lebih kuat. Hal ini serupa dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Shaldam dkk. terhadap 14 senyawa dari madu dan propolis yang ditambatkan dengan reseptor Mpro SARS-CoV-2 kode 6LU7.⁶⁸ Penelitian tersebut menggunakan enam ligan uji yang sama dengan penelitian ini, yaitu *chrysins, ellagic acid, kaempferol, p-coumaric acid, quercetin, dan syringic acid*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa keenam senyawa tersebut dapat tertambat dengan reseptor, walaupun PDB ID Mpro yang digunakan berbeda. Ikatan antara *syringic acid* dan *p-coumaric* pada reseptor lebih lemah dibandingkan dengan ligan acuan

N3 (energi afinitas lebih positif, sekitar -5 kKal/mol), sedangkan ligan yang lainnya memiliki energi afinitas yang lebih kuat dan lebih negatif dibandingkan ligan acuan N3 (sekitar -7 kKal/mol).

Evaluasi terhadap kekuatan ikatan/energi afinitas antara reseptor dan ligan perlu dilakukan dengan menginvestigasi residu-residu asam amino dari reseptor yang membentuk ikatan dengan molekul ligan. Ligan perlu menduduki residu-residu asam amino yang tepat untuk memberikan pengaruh fungsional terhadap reseptor, termasuk pengaruh inhibisi. Dalam penelitian ini, digunakan ligan acuan N3 yang sudah tertambat pada struktur kristal 7BQY yang diasumsikan menempati residu-residu asam amino yang mempengaruhi inhibisi reseptor. Persentasi kemiripan interaksi ligan dan reseptor dengan ligan acuan N3 digunakan sebagai alat evaluasi ketepatan ligan menduduki area inhibisi dari reseptor.

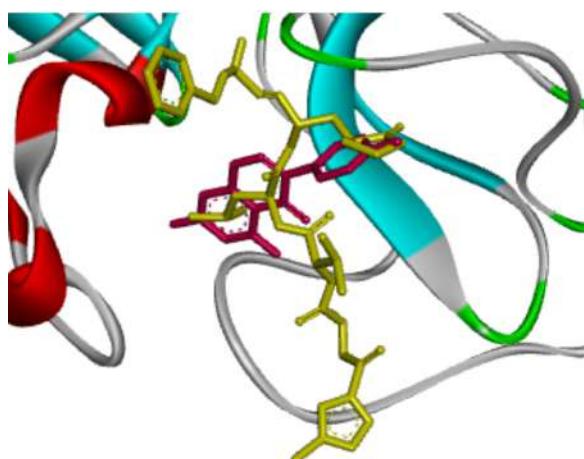
Selain itu, investigasi juga dilakukan terhadap interaksi ligan dengan residu-residu asam amino yang bertanggung jawab membentuk area *active site*, *binding site*, dan *covalent bonding* yang dapat dilihat pada sekvens struktur sekunder reseptor. *Active site* merupakan bagian reseptor yang digunakan untuk menerima substrat. Ikatan ligan dengan area *active site* akan menghambat kerja reseptor karena substrat alami tidak dapat menempel pada *active site*. *Binding site* merupakan bagian dari reseptor yang dapat berinteraksi secara alami dengan ligan-ligan lain dan dapat memberikan pengaruh fungsional reseptor. Interaksi antara ligan dengan area *binding site* diasumsikan dapat memberikan efek inhibisi pada reseptor. Residu asam amino yang dapat membentuk *covalent bonding* merupakan bagian yang secara alami dapat berinteraksi dengan ligan membentuk ikatan kovalen yang kekuatannya jauh lebih kuat dari ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik karena tergolong sebagai ikatan intramolekul. Residu-residu asam amino yang bertanggung jawab membentuk area *active*

site, *binding site*, dan *covalent bonding* juga digunakan sebagai alat evaluasi yang tergabung sebagai area cakupan inhibisi.

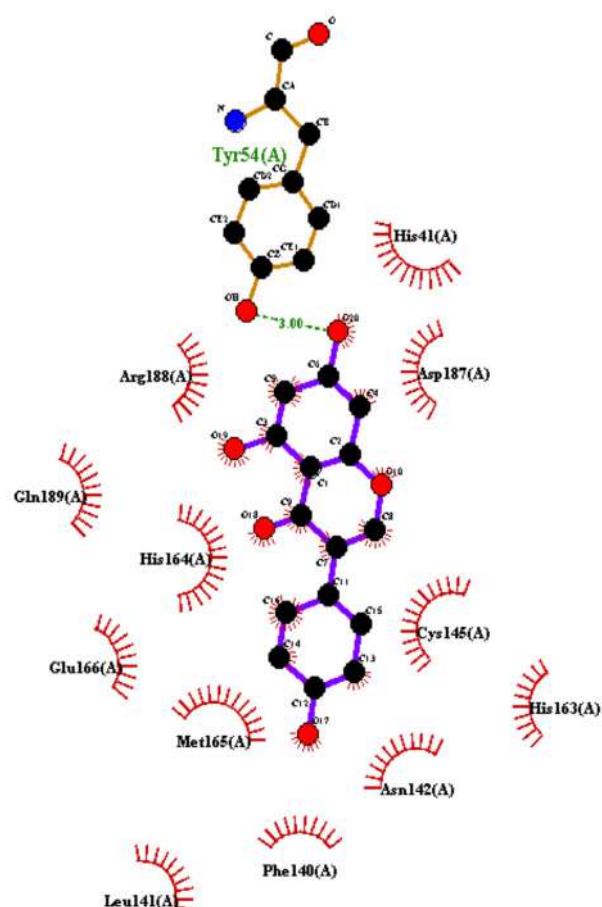
Hasil evaluasi menunjukkan bahwa hanya terdapat 2 senyawa fenolik madu yang memiliki kemiripan dengan ligan acuan N3 dan persentasi area cakupan lebih dari 60%, yaitu rutin dan genistein. Kedua senyawa ini juga memiliki energi afinitas yang lebih kuat (lebih negatif) dari ligan acuan N3. Dari kedua senyawa fenolik ini, hanya genistein yang juga memenuhi Ro5 Lipinski, sedangkan rutin tidak memenuhi Ro5. Intervensi terhadap penggunaan genistein dapat disarankan secara oral sedangkan rutin tidak disarankan secara oral.

Evaluasi juga dilakukan terhadap senyawa antiviral sintetik. Sebanyak 3 dari 4 senyawa antiviral sintetik yang digunakan memiliki persentasi kemiripan dengan ligan acuan N3 dan persentasi area cakupan inhibisi lebih dari 60%, yaitu remdesivir ritonavir, dan lopinavir. Namun, ketiga senyawa antiviral sintetik ini tidak memenuhi Ro5 sehingga intervensi pemberian tidak disarankan secara oral.

Berdasarkan indikator-indikator yang diuji pada penelitian ini, kami menemukan bahwa genistein merupakan kandidat senyawa fenolik madu paling berpotensi sebagai inhibitor Mpro SARS-CoV-2 karena memiliki energi afinitas -7,6 kKal/mol, kemiripan 80% dengan N3, dan menempati 63,64% area cakupan penambatan, memenuhi semua Ro5 Lipinski, bersifat tidak toksik dan bukan karsinogen, serta diprediksi sebagai inhibitor lemah hERG. Visualisasi interaksi 3D dari genistein dapat dilihat pada Gambar 6 dan residu yang berinteraksi secara 2D dapat dilihat pada Gambar 7. Genistein merupakan isoflavon yang dilaporkan memiliki aktivitas antivirus, beberapa diantaranya ditujukan sebagai obat untuk melawan HIV,⁶⁹ herpes B,⁷⁰ dan *arenaviral hemorrhagic fever*.¹ Genistein dilaporkan dapat ditemukan dari madu akasia, ailanthus, kastanya, *savory*, dan timi (*thymus*).^{15,72}



Gambar 6. Visualisasi 3D Penambatan Molekuler Genistein (Merah Muda) Dibandingkan dengan Ligand Acuan N3 (Kuning) dengan Reseptor Mpro SARS-CoV-2 Kode 7BQY



Gambar 7. Residu Asam Amino Reseptor Mpro SARS-CoV-2 yang Berinteraksi dengan Genistein secara 2D

KESIMPULAN

Penambatan molekuler terhadap 27 senyawa fenolik dari madu dan 4 senyawa antiviral sintetik telah berhasil dilakukan. Berdasarkan skrining Ro5, prediksi toksitas admetSAR, analisis energi afinitas, serta analisis interaksi molekuler yang meliputi kemiripan interaksi dengan N3 dan persentasi area cakupan inhibisi (*active site*, *binding site*, dan *covalent bonding*), genistein merupakan senyawa fenolik dari madu yang paling potensial dalam menginhibisi reseptor Mpro SARS-CoV-2. Adapun hasil studi *in silico* terhadap genistein yaitu intervensi dapat diberikan secara oral (memenuhi Ro5: 5/5), bersifat tidak toksik, bersifat bukan karsinogen, memiliki energi afinitas yang lebih kuat dibandingkan ligan pembanding N3 (-7,6 kKal/mol), memiliki interaksi molekuler yang mirip dengan N3 (80%), dan memiliki persentasi area cakupan inhibisi yang tinggi (63,64%). Penemuan dalam penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

SARAN

Penelitian penambatan molekuler secara *in silico* senyawa fenolik madu dapat dilakukan menggunakan reseptor SARS-CoV-2 lainnya untuk melihat kompleksitas interaksi ligan dan reseptor. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait efikasi senyawa fenolik madu secara *in vitro* dan *in vivo* dalam inhibisi replikasi virus SARS-CoV-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Cianciosi *et al.* (2018) atas studi literatur terhadap senyawa fenolik madu dan Liu *et al.* (2020) yang telah melakukan penelitian dan mendepositkan struktur kristal Mpro SARS-CoV-2 kode 7BQY.

DAFTAR PUSTAKA

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020 Feb;382(8):727–33.

2. Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2020 Sep;30(17):127377.
3. Khan SA, Al-Balushi K. Combating COVID-19: The role of drug repurposing and medicinal plants. *J Infect Public Health.* 2021 Apr;14(4):495–503.
4. Jones SL, Jones HR, Thrasyvoulou A. Disseminating research about bee products. A review of articles published in the Journal of Apicultural Research over the past fifty years. *J ApiProduct ApiMedical Sci.* 2011;3(3):105–16.
5. Agus A, Agussalim, Nurliyani, Umami N, Budisatria IGS. Evaluation of antioxidant activity, phenolic, flavonoid and vitamin C content of several honeys produced by the Indonesian stingless bee: *Tetragonula laeviceps*. *Livest Res Rural Dev.* 2019;31(10):2014–20.
6. Biluca FC, de Gois JS, Schulz M, Braghini F, Gonzaga LV, Maltez HF, et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). *J Food Compos Anal.* 2017;63:89–97.
7. Cheung Y, Meenu M, Yu X, Xu B. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *Int J Food Prop.* 2019;22(1):290–308.
8. Ciucure CT, Geană E-I. Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochem Anal.* 2019 Jul;30(4):481–92.
9. Combarros-Fuertes P, Estevinho LM, Dias LG, Castro JM, Tomás-Barberán FA, Tornadijo ME, et al. Bioactive components and antioxidant and antibacterial activities of different varieties of honey: a screening prior to clinical application. *J Agric Food Chem.* 2019;67(2):688–98.
10. Mahnot NK, Saikia S, Mahanta CL. Quality characterization and effect of sonication time on bioactive properties of honey from North East India. *J Food Sci Technol.* 2019 Feb;56(2):724–36.
11. Mohammed MEA, Shati AA, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, Alshehri MA, Alhag SK, et al. Acacia honey from different altitudes: total phenols and flavonoids, laser-induced fluorescence (LIF) spectra, and anticancer activity. *J Int Med Res.* 2020 Aug;48(8):1–12.
12. Riswahyuli Y, Rohman A, Setyabudi FMCS, Raharjo S. Evaluation of phenolic content and free radical scavenging activity of Indonesia wild honey collected from seven different regions. *J Food Res.* 2019;8(6):94–103.
13. Silva TMS, dos Santos FP, Evangelista-Rodrigues A, da Silva EMS, da Silva GS, de Novais JS, et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *J Food Compos Anal.* 2013 Feb;29(1):10–8.
14. Wieczorek J, Pietrzak M, Pomianowski J, Wieczorek Z. Honey as a source of bioactive compounds. *Polish J Nat Sci.* 2014;29(3):275–85.
15. Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboreda-Rodríguez P, Manna PP, et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules.* 2018;23(9):2322.
16. Albaridi NA. Antibacterial potency of honey. *Hindawi Int J Microbiol.* 2019;2019:2464507.
17. Almasaudi SB, Al-Nahari AAM, Abd El-Ghany ESM, Barbour E, Al Muhyaywi SM, Al-Jaouni S, et al. Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24:1255–61.
18. Anand S, Deighton M, Livanos G, Pang ECK, Mantri N. Agastache honey has superior antifungal activity in comparison with important commercial honeys. *Sci Rep.* 2019;9:18197.
19. Anyanwu, C.U. Investigation of in vitro antifungal activity of honey. *J Med Plants Res.* 2012;6(18):3512–6.
20. Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;10:71–82.
21. Candiracci M, Citterio B, Diamantini G, Blasa M, Accorsi A, Piatti E. Honey flavonoids, natural antifungal agents against *Candida albicans*. *Int J Food Prop.* 2011;14(4):799–808.
22. Libonatti C, Varela S, Basualdo M. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *J Microbiol Antimicrob.* 2014;6(3):51–6.
23. Mandal MD, Mandal S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):154–60.

24. Moussa A, Noureddine D, Saad A, Abdelmelek M, Abdelkader B. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2(7):554–7.
25. Shahzad A, Cohrs RJ. In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Transl Biomed.* 2012;3(2):2.
26. Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza viral effects of honey in vitro: Potent high activity of Manuka honey. *Arch Med Res.* 2014;45(5):359–65.
27. Ahmed S, Othman NH. The anti-cancer effects of Tualang honey in modulating breast carcinogenesis: An experimental animal study. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17:208.
28. Borsato DM, Prudente AS, Döll-Boscardin PM, Borsato A V., Luz CFP, Maia BHLNS, et al. Topical Anti-inflammatory activity of a monofloral honey of Mimosa scabrella Provided by melipona marginata during winter in Southern Brazil. *J Med Food.* 2014;17(7):817–25.
29. Chua LS, Rahaman NLA, Adnan NA, Eddie Tan TT. Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *J Anal Methods Chem.* 2013;2013:313798.
30. Djakaria SA, Batubara I, Raffiudin R. Antioxidant and antibacterial activity of selected indonesian honey against bacteria of acne. *J Kim Sains dan Apl.* 2020;23(8):267–75.
31. Güл A, Pehlivan T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi J Biol Sci.* 2018;25(6):1056–65.
32. Ibrahim H, Hajdari A. Phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Kosovo. *J Apic Res.* 2020;59(4):452–7.
33. Khan SU, Anjum SI, Rahman K, Ansari MJ, Khan WU, Kamal S, et al. Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi J Biol Sci.* 2018 Feb;25(2):320–5.
34. Ruiz-Ruiz JC, Matus-Basto AJ, Acereto-Escoffié P, Segura-Campos MR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food Agric Immunol.* 2017;28(6):1424–37.
35. Sumarlin LO, Muawanah A, Afandi FR, Adawiah. Inhibitory activity of HEp-2 Cells by honey from Indonesia. *J Kim Sains dan Apl.* 2019;22(6):317–25.
36. Dar AM, Mir S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech.* 2017;08(02):8–10.
37. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided-Drug Des.* 2012;7(2):146–57.
38. Schleinkofer K, Wang T, Wade RC. Molecular Docking. *Encycl Ref Genomics Proteomics Mol Med.* 2006;443:1149–53.
39. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2009;31:455–61.
40. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009 Dec;30(16):2785–91.
41. BIOVIA. Discovery Studio Visualizer. Dassault Systèmes. 2020.
42. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel.* 1995 Feb;8(2):127–34.
43. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J Cheminform.* 2011 Oct;3(10):33.
44. Open Babel. The Open Babel Package, version 2.3.1.
45. [ACD] ACDI. Chemistry Software for Analytical and Chemical Knowledge Management: ACD/ChemSketch, version 2016.1. 2020.
46. Costanzo M, De Giglio MAR, Roviello GN. SARS-CoV-2: Recent reports on antiviral therapies based on lopinavir/ritonavir, darunavir/umifenovir, hydroxychloroquine, remdesivir, favipiravir and other drugs for the treatment of the new Coronavirus. *Curr Med Chem.* 2020;27:4536–41.

47. Hull MW, Montaner JSG. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. Ann Med. 2011 Aug;43(5):375–88.
48. Mangum EM, Graham KK. Lopinavir-Ritonavir: A new protease inhibitor. Pharmacotherapy. 2001 Nov;21(11):1352–63.
49. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. Vol. 93, Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences. Japan Academy; 2017. p. 449–63.
50. Konkolova E, Dejmek M, Hřebábecký H, Šála M, Böserle J, Nencka R, et al. Remdesivir triphosphate can efficiently inhibit the RNA-dependent RNA polymerase from various flaviviruses. Antiviral Res. 2020 Oct;182:104899.
51. Liu X, Zhang B, Jin Z, Yang H, Rao Z. 7BQY: The Crystal Structure of Covid- 19 Main Protease in Complex With an Inhibitor N3 at 1.7 Angstrom. 2020.
52. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. Nature. 2020 Jun;582(7811):289–93.
53. Prisant MG, Williams CJ, Chen VB, Richardson JS, Richardson DC. New tools in MolProbity validation: CaBLAM for CryoEM backbone, UnDowser to rethink “waters,” and NGL Viewer to recapture online 3D graphics. Protein Sci. 2020 Jan;29:315–29.
54. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Mar;46(1–3):3–26.
55. Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. J Chem Inf Model. 2012 Nov;52(11):3099–105.
56. Christian Baber J, Thompson DC, Cross JB, Humblet C. GARD: A generally applicable replacement for RMSD. J Chem Inf Model. 2009 Aug;49(8):1889–900.
57. Lu H-M, Yin D-C, Ye Y-J, Luo H-M, Geng L-Q, Li H-S, et al. Correlation between protein sequence similarity and X-Ray diffraction quality in the Protein Data Bank. Protein Pept Lett. 2009 Jan;16(1):50–5.
58. Laskowski RA, Furnham N, Thornton JM. The Ramachandran plot and protein structure validation. In: Bansal M, Srinivasan N, editors. Biomolecular forms and functions. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing; 2013. p 62–75. doi:10.1142/9789814449144_0005
59. Xiong J. Essential bioinformatics. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
60. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. J Comb Chem. 1999;1(1):55–68.
61. Guan L, Yang H, Cai Y, Sun L, Di P, Li W, et al. ADMET-score-a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. Medchemcomm. 2019 Jan;10(1):148–57.
62. Kalyaanamoorthy S, Barakat KH. Development of safe drugs: the hERG challenge. Med Res Rev. 2018;38(2):525–55.
63. Marchese Robinson RL, Glen RC, Mitchell JBO. Development and comparison of hERG blocker classifiers: Assessment on different datasets yields markedly different results. Mol Inform. 2011 May;30(5):443–58.
64. Föllmann W, Degen G, Oesch F, Hengstler JG. Ames test. In: Maloy S, Hughes K, editors. London: Academic Press; 2013. p 104–7.
65. Environmental Protection Agency US [EPA U. Chapter 7: Precautionary Statements. In: Office of Pesticide Programs (OPP) Label Review Manual. 2018. p. 7–2 – 7–9.
66. Ferdian PR, Elfirta RR, Emilia Q, Ikhwani AZN. Inhibitory potential of black seed (*Nigella sativa* L.) bioactive compounds towards main protease of SARS-CoV-2: in silico study. Ann Bogor. 2020;24(2):81–94.
67. Ho BK, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. BMC Struct Biol. 2005 Aug;5(1):14.
68. Shaldam MA, Yahya G, Mohamed NH, Abdel-Daim MM, Naggar Y Al. In silico screening of potent bioactive compounds from honey bee products against COVID-19 target enzymes. ChemRxiv. ChemRxiv; 2020.

69. Sauter D, Schwarz S, Wang K, Zhang R, Sun B, Schwarz W. Genistein as antiviral drug against HIV ion channel. *Planta Med.* 2014 Jun;80(8–9):682–7.
70. LeCher JC, Diep N, Krug PW, Hilliard JK. Genistein has antiviral activity against Herpes B virus and acts synergistically with antiviral treatments to reduce effective dose. *Viruses.* 2019 May;11(6):499.
71. Vela EM, Knostman KA, Mott JM, Warren RL, Garver JN, Vela LJ, et al. Genistein, a general kinase inhibitor, as a potential antiviral for arenaviral hemorrhagic fever as described in the Piryatavirus-Syrian golden hamster model. *Antiviral Res.* 2010 Sep;87(3):318–28.
72. Pichichero E, Canuti L, Canini A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J Sci Food Agric.* 2009 Mar;89(4):609–16.