



Studi *In Silico* Potensi Piperine, Piperlongumine, dan Thymoquinone Sebagai Obat Alzheimer

Yanuar Metriks Mutiara, Mariana Wahjudi, Tjie Kok*

Magister Bioteknologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Jl. Raya Tenggilis Mejoyo, Kota Surabaya, Jawa Timur 60293, Indonesia

*Corresponding Author: tjie_kok@staff.ubaya.ac.id

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) was suffered by 30-35 million patients worldwide and predicted to increase to 400% within 30 years in Indonesia. One of the accepted therapeutics for AD is galantamine, a short-acting acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, isolated from *Galanthus nivalis*. Due to the need for new drugs with fewer side effects than synthetic drugs, herbal compounds have become widely accepted. The aim of the study is to determine the efficacy of piperine (PIP), piperlongumine (PL), and thymoquinone (TQ) from *Piper retrofractum*, *Piper betle* var. *nigra*, and *Nigella sativa* as drugs for AD. Structures of the compounds were obtained from PubChem, then Chimera built its 3D structures and Autodock, PyRx, and Biovia Discovery Studio Visualization were used for molecular docking. PASS way2drug was used to predict bioactivities, Swiss ADME and pkCSM were used to predict physicochemical and pharmacokinetic properties. Based on the predicted physicochemical and pharmacokinetic properties, the three compounds qualify as drugs. Molecular docking showed that all the three can interact with receptors. For interaction with AChE, PIP is the best, followed by PL and TQ. For interaction with butyrylcholinesterase (BChE), PL is the best, followed by PIP and TQ. Even though the TQ binding affinity was lower than the other two compounds, TQ was able to penetrate the blood brain barrier (BBB) easily and has potentially active biological activity (P_a value > 0.7) related to AD more than the other two compounds. Hence, TQ has higher potential to be further studied *in vitro* and *in vivo* for AD treatment.

Keywords: alzheimer disease, piperine, piperlongumine, thymoquinone

Abstrak

Alzheimer disease (AD) diderita oleh 30-35 juta penderita di dunia dan diperkirakan akan meningkat hingga 400% dalam 30 tahun kedepan di Indonesia. Salah satu obat yang telah diterima untuk pengobatan AD diisolasi dari tanaman *Galanthus nivalis* berperan sebagai inhibitor acetylcholinesterase (Ache), galantamine, yang memiliki efek yang singkat. Penerimaan terhadap senyawa herbal semakin luas karena kebutuhan obat baru dengan efek samping lebih sedikit dibandingkan obat sintesis. Studi ini bertujuan untuk mengetahui potensi piperine (PIP), piperlongumine (PL), dan thymoquinone (TQ) yang berasal dari Cabe Jawa (*Piper retrofractum*), Sirih Hitam (*Piper betle* var. *nigra*), dan Jinten Hitam (*Nigella sativa*) sebagai obat AD. Struktur senyawa diperoleh dari PubChem, kemudian struktur 3D-nya dibangun menggunakan Chimera agar kompatibel untuk docking molekular dengan Autodock, PyRx, dan Biovia Discovery Visualization. Aktivitas biologi ketiganya diprediksi menggunakan PASS way2drug, sedangkan sifat fisikokimia dan farmakokinetiknya dengan Swiss ADME dan pkCSM. Berdasarkan prediksi sifat fisikokimia dan farmakokinetik, ketiga senyawa tersebut memenuhi syarat sebagai obat. Docking molekular menunjukkan bahwa ketiganya dapat berinteraksi dengan reseptor. Untuk interaksi dengan Ache, PIP paling baik, disusul dengan PL dan TQ. PL Untuk interaksi dengan butyrylcholinesterase (Bche), PL paling baik, disusul dengan PIP dan TQ. Walaupun nilai *binding affinity* TQ lebih rendah dibandingkan kedua senyawa lainnya, namun TQ lebih mudah menembus *blood brain barrier* (BBB)

dan memiliki aktivitas biologi yang berpotensi aktif (nilai $Pa > 0.7$) terkait AD lebih banyak dibandingkan kedua senyawa lainnya. Dengan demikian, TQ berpotensi lebih tinggi untuk dipelajari lebih lanjut secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk penanganan AD.

Kata Kunci : *alzheimer disease, piperine, piperlongumine, thymoquinone*

PENDAHULUAN

Neurodegenerative disease (ND) adalah penyakit kronis dan progresif yang disebabkan oleh kematian neuron akibat stres oksidatif, neuroinflamasi, dan eksitosisitas. Hingga saat ini pengobatan untuk ND belum ditemukan dan perawatannya memerlukan biaya yang tinggi. Salah satu jenis ND, yaitu *alzheimer disease* (AD), telah diderita oleh 30-35 juta penduduk di dunia (1). Berdasarkan statistik, terjadi kasus AD hingga 1,2 juta dan diperkirakan akan terus meningkat hingga 400% dalam 30 tahun kedepan di Indonesia (2). Stres oksidatif, neuroinflamasi, dan eksitosisitas menginduksi akumulasi peptida *amiloid-β* ($A\beta$) sehingga membentuk plak di otak yang akan berlanjut pada degenerasi saraf. Adanya plak ini meningkatkan kemungkinan perkembangan penyakit dari gangguan kognitif ringan hingga demensia. Selanjutnya, plak $A\beta$ akan memicu *tau tangles* yang juga merupakan *hallmark* perkembangan AD (3).

Saat ini, perawatan AD yang paling umum dilakukan adalah dengan menghambat *acetylcholinesterase* (AChE), sehingga *acetylcholine* (ACh) tidak dihidrolisis dan konsentrasinya di otak meningkat (4). Oleh karena itu, AChE yang diduga berperan besar dalam kesehatan otak dan *butyrylcholinesterase* (BChE) yang walaupun berperan kecil dalam mengatur tingkat ACh otak seringkali menjadi target dalam strategi perawatan AD. AChE dan BChE terbukti terdapat di *neurofibrillary tangles* dan plak neuritic di otak, menghentikan ACh dan *butyrylcholine* (BCh) pada celah sinaptik dengan membelah neurotransmitter tersebut menjadi kolin dan asetat.

Senyawa herbal telah diterima luas karena kebutuhan terhadap obat baru dan efek sampingnya yang lebih sedikit dibandingkan dengan obat-obatan sintesis. Tanaman herbal yang dikenal memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antiinflamasi dapat menjadi alternatif yang menarik untuk terapi AD. Terdapat beberapa tanaman herbal yang dilaporkan telah digunakan dalam perawatan AD, diantaranya yaitu *Centella asiatica*, *Ginkgo biloba*, *Withania somnifera*, *Bacopa monnieri*, *Salvia officinalis*,

Melissa officinalis, *Tinospora cordifolia*, *Glycyrrhiza glabra*, dan lain-lain (4). Saat ini ada beberapa obat yang telah diterima untuk pengobatan AD, satu diantaranya diisolasi dari tanaman *Galanthus nivalis* yang perannya dalam patologi AD adalah sebagai inhibitor AChE, yaitu *galantamine* (5). Selain itu, terdapat beberapa senyawa herbal yang telah banyak diteliti dan dilaporkan memiliki aktivitas terhadap $A\beta$ dalam model eksperimental AD diantaranya adalah *resveratrol*, *curcumin*, *barberine*, *catechin*, *morin*, dan lain-lain (6). Diantara senyawa herbal yang populer pada *drug discovey* AD, studi ini akan mempelajari lebih lanjut mengenai *piperine* (PIP), *piperlongumine* (PL), dan *thymoquinone* (TQ). Pada umumnya PIP telah banyak dimanfaatkan sebagai *bioenhancer* untuk meningkatkan bioavailabilitas obat yang dikombinasikan dengannya (7). Begitu pula dengan PL yang secara tradisional telah dimanfaatkan dalam pengobatan penyakit pencernaan, saluran pernafasan, dan menular seperti malaria (8). Secara tradisional TQ telah dimanfaatkan untuk mengobati banyak penyakit, misalnya asma, hipertensi, diabetes, peradangan, batuk, dan lain-lain dalam berbagai bentuk. Baru-baru ini TQ telah dilaporkan efektif untuk menghambat berbagai tahap kanker seperti proliferasi, migrasi dan invasi. Selain itu, TQ juga berperan sebagai senyawa antikanker (9). Secara lebih spesifik, pada studi ini akan dipelajari lebih lanjut mengenai PIP yang berasal dari *Piper retrofractum* atau Cabe Jawa, *piperlongumine* (PL) yang berasal dari *Piper betle* var. *nigra* atau Sirih Hitam, dan *thymoquinone* (TQ) yang berasal dari *Nigella sativa* atau Jinten Hitam untuk menambah literatur senyawa herbal yang berpotensi untuk perawatan AD.

METODE PENELITIAN

Pada studi ini dilakukan penelusuran literatur mengenai senyawa herbal yang berpotensi dalam pengobatan AD, dipilih senyawa yang informasinya masih terbatas. Kemudian studi literatur dilanjutkan untuk mencari tanaman herbal yang mengandung senyawa tersebut. Data tanaman herbal yang

mengandung senyawa tersebut disinkronkan dengan katalog budidaya tanaman herbal di kebun organik kolaborasi dengan mitra industri agar tanaman yang telah dibudidaya dapat dimanfaatkan potensinya. Selanjutnya, senyawa herbal tersebut dipelajari lebih lanjut untuk mengetahui sifat fisikokimia farmakokinetik, aktivitas biologi, dan interaksinya dalam studi *docking* molekular.

Untuk memperoleh formula PIP (CID: 638024), PL (CID: 637858), dan TQ (CID: 10281) struktur 3D metabolit sekunder potensial yang telah diperoleh dimulai dengan mencari *canonical SMILES* metabolit sekunder potensial tersebut pada *web server* PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Setelah itu, *channonical SMILES* yang telah diperoleh dibangun menjadi struktur 3D menggunakan *software* Chimera, sehingga kompatibel dengan 3D protein format pdb.

Selanjutnya sifat fisikokimia, farmakokinetik, dan parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME) dari senyawa PIP, PL, dan TQ diprediksi menggunakan Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/>). Prediksi farmakokinetik lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml>). Secara sederhana, senyawa herbal yang memenuhi syarat sebagai obat akan memiliki *lipophilicity*, *solubility*, *saturation*, *flexibility*, *polaritas*, dan ukuran molekul dalam *bioavailability range*.

Aktivitas biologi PIP, PL, dan TQ diprediksi menggunakan *web server* PASS way2drug (<http://way2drug.com/PassOnline/>). Dari *web server* ini dapat diketahui seluruh aktivitas yang kemungkinan diperankan oleh ketiga senyawa herbal tersebut. Pada hasil analisa PASS way2drug terdapat beberapa simbol yang mendeskripsikan senyawa herbal tersebut, yaitu Pa (*probability active*) mendeskripsikan aktivitas biologi senyawa herbal berpotensi aktif, sedangkan Pi (*probability inactive*) mendeskripsikan aktivitas biologi senyawa herbal berpotensi tidak aktif. Apabila nilai Pa > 0.7, maka aktivitas biologi berpotensi tinggi untuk aktif.

Struktur 3D reseptor AChE (PDB ID: 6U3P) dan BChE (PDB ID: 2J4C) didapatkan pada *database* RCSB PDB (<https://www.rcsb.org>). Struktur 3D yang dipilih adalah yang berasal dari organisme *Homo sapiens*. Kemudian, struktur 3D yang telah diperoleh dipreparasi dengan menghilangkan molekul air dan bagian yang tidak diperlukan, untuk selanjutnya dilakukan *docking* molekular

menggunakan *software* Autodock yang kemudian divisualisasikan dalam *software* Biovia Discovery Studio Visualization. Struktur 3D reseptor serta PIP, PL, dan TQ yang telah diperoleh diprediksi interaksinya melalui studi *docking* molekular menggunakan *software* PyRx. Hasil studi *docking* molekular akan memberikan nilai *binding affinity*, dan RMSD (*root-mean-square deviation*). Nilai RMSD akan ada 2, yaitu RMSD *lower bound* (RMSD lb.), dan RMSD *upper bound* (RMSD ub.).

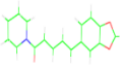
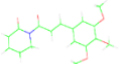
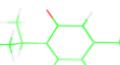
HASIL PENELITIAN

Setelah dilakukan studi literatur mengenai AD, senyawa herbal terkait, dan tanaman herbal yang mengandung senyawa tersebut (pada katalog tanaman herbal di kebun organik perusahaan rekanan; tidak dipublikasikan, untuk kalangan sendiri) terpilih 3 senyawa herbal yaitu PIP, PL, dan TQ. Informasi ketiga senyawa tersebut terkait AD minim, namun disebutkan bahwa PIP diduga berpotensi dalam pengobatan AD (10). Disisi lain, PIP disebut sebagai senyawa herbal yang menjanjikan dalam pengembangan inhibitor AChE yang efisien untuk pengobatan AD (11). Begitu pula dengan TQ yang diduga berpotensi dalam pengobatan AD (12). PIP ditemukan dalam Cabe Jawa, PL pada Sirih Hitam (*Piper betle var. nigr*), dan TQ pada Jinten Hitam (*Nigella sativa*) pada katalog tersebut. Dari *web server* PubChem diperoleh *canonical SMILES* PIP, PL, dan TQ, yang selanjutnya dibangun struktur 3D-nya menggunakan *software* Chimera.

Berdasarkan hasil analisa dengan *web server* SWISS ADME, diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ memenuhi kriteria *druglikeness Lipinski's rule of five* yang didasarkan pada sifat farmakokinetik seperti penyerapan, distribusi, metabolisme dan ekskresi pada sifat fisikokimia tertentu (13). Selain itu, dari hasil analisa *web server* pkCSM diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ lebih mudah larut dalam lipid dibandingkan air yang ditunjukkan oleh nilai solubilitas air secara berurutan sebesar -3.464 log mol/L, -3.288 log mol/L, dan -1.613 log mol/L. Semakin negatif nilai solubilitas air, maka semakin sulit larut dalam air. Ketiganya juga diperkirakan dapat menembus sel epitel usus manusia, sehingga obat dapat dimasukkan secara oral yang ditunjukkan nilai Caco2 (cancer coli 2) permeability lebih dari 0,9 log Papp dalam 10⁻⁶ cm/s. PIP, PL, dan TQ juga menunjukkan penyerapan di saluran pencernaan

tinggi melalui nilai absorpsi usus yang lebih dari 30%.

Tabel 1. Hasil Pencarian dan Pemodelan Struktur 3D PIP, PL, dan TQ.

Metabolit Sekunder Potensial	Canonical SMILES	Struktur 3D
PIP	<chem>C1CCN(CC1)C(=O)C=CC=CC2=CC3=C(C=C2)O</chem>	
PL	<chem>COC1=CC(=CC(=C1OC)OC)C=CC(=O)N2CCC=CC2=O</chem>	
TQ	<chem>CC1=CC(=O)C(=CC1=O)C(C)C</chem>	

Berdasarkan hasil analisa dengan web server SWISS ADME, diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ memenuhi kriteria *druglikeness Lipinski's rule of five* yang didasarkan pada sifat farmakokinetik seperti penyerapan, distribusi, metabolisme dan ekskresi pada sifat fisikokimia tertentu (13). Selain itu, dari hasil analisa web server pkCSM diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ lebih mudah larut dalam lipid dibandingkan air yang ditunjukkan oleh nilai solubilitas air secara berurutan sebesar -3.464 log mol/L, -3.288 log mol/L, dan -1.613 log mol/L. Semakin negatif nilai solubilitas air, maka semakin sulit larut dalam air. Ketiganya juga diperkirakan dapat menembus sel epitel usus manusia, sehingga obat dapat dimasukkan secara oral yang ditunjukkan nilai Caco2 (cancer coli 2) permeability lebih dari 0,9 log Papp dalam 10^{-6} cm/s. PIP, PL, dan TQ juga menunjukkan penyerapan di saluran pencernaan tinggi melalui nilai absorpsi usus yang lebih dari 30%.

Selanjutnya, pada prediksi distribusi diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ lebih terkonsentrasi dalam plasma darah dibandingkan dalam jaringan yang ditunjukkan oleh nilai volume distribusi kurang dari 0.71 log L/kg (Tabel 2). Diketahui pula persentase obat yang tidak berikatan dengan protein plasma dalam nilai fraksi tidak terikat (*fraction unbound*) secara berurutan untuk PIP, PL, dan TQ adalah 13.4%, 22.7%, dan 52.7%. Berdasarkan nilai permeabilitas BBB, PIP, PL, dan TQ dikategorikan

sebagai sukar, sukar, dan mudah menembus BBB. Nilai permeabilitas yang kurang dari -0.1 log BB berarti sukar melewati BBB. PIP, PL, dan TQ diketahui berpenetrasi pada CNS, yang ditunjukkan oleh nilai permeabilitas CNS lebih besar daripada -3 log PS. Jika nilai permeabilitas CNS kurang dari -3 log PS, maka senyawa tidak berpenetrasi dalam CNS..

Pada prediksi metabolisme diketahui PIP dan PL merupakan substrat untuk CYP3A4 (Tabel 2). CYP3A4 merupakan enzim yang memetabolisme hampir 50% obat. PIP juga diketahui sebagai inhibitor CYP2C19 seperti yang tertera pada hasil analisa menggunakan pkCSM (Tabel 2). Hal ini penting untuk diketahui sebagai pertimbangan kadar yang akan dikonsumsi. Dari sisi metabolisme obat, apabila sebuah senyawa berperan sebagai substrat maka bioavailabilitasnya akan berkurang karena senyawa tersebut akan dimetabolisme menjadi senyawa yang relatif lebih polar agar lebih mudah diekskresi. Namun, apabila senyawa berperan sebagai inhibitor yang menghambat kerja sitokrom P450, maka senyawa tersebut menyebabkan bioavailabilitas senyawa lain akan meningkat (14), sehingga dapat menimbulkan toksisitas. Diketahui bahwa TQ bukan merupakan substrat maupun inhibitor bagi sitokrom P450.

Selanjutnya, dalam prediksi ekskresi diketahui laju pembersihan obat dalam tubuh yang merupakan kombinasi antara *hepatic clearance* (liver dan billiary) dengan *renal clearance* dari PIP, PL, dan TQ masing-masing adalah sebesar 0.232 log ml/min/kg, 0.215 log ml/min/kg, dan 0.225 log ml/min/kg (Tabel 2). Semakin besar nilai laju pembersihan, maka senyawa semakin mudah diekskresi sehingga tidak terakumulasi dalam tubuh. Selain itu, PIP juga diketahui merupakan *renal organic cation transporter substrate 2 (renal OCT2 substrate)*, yaitu senyawa yang merupakan substrat OCT2 dan biasanya akan diabsorpsi kembali.

Berdasarkan prediksi toksisitas diketahui bahwa PIP, PL, dan TQ tidak bersifat mutagen berdasarkan tes toksisitas Ames, yang berarti tidak menyebabkan mutasi pada bakteri uji (Tabel 2). Ketiganya memiliki dosis maksimum yang bisa ditoleransi yang tergolong rendah, yaitu sebesar 0.38 log m/kg/hari untuk PIP, 0.462 log m/kg/hari untuk PL, dan 0.89 log m/kg/hari untuk TQ (Tabel 2). Toleransi dosis maksimum menunjukkan dosis yang aman dikonsumsi, digunakan untuk menentukan dosis awal yang diberikan pada uji klinis fase I dalam

menentukan dosis efektif dan dosis letal obat. PIP, PL, dan TQ juga bukan merupakan inhibitor hEGR I dan II, sehingga tidak toksik bagi jantung karena tidak menyebabkan hambatan pada kanal kalium yang dikodekan oleh hEGR I yang dapat menginduksi verticular artisemia. LD50 dari PIP, PL, dan TQ secara berurutan adalah sebesar 2.811 mol/kg, 2.449 mol/kg, 1.743 mol/kg. PIP, PL, dan TQ diketahui memiliki LOAEL sebesar 1.51 log mg/kg berat badan (bb)/hari, 1.492 log mg/kg bb/hari, dan 2.378 log mg/kg bb/hari (Tabel 2). Ketiganya diketahui bersifat hepatoksik dan tidak berpotensi menyebabkan alergi kulit kecuali TQ.

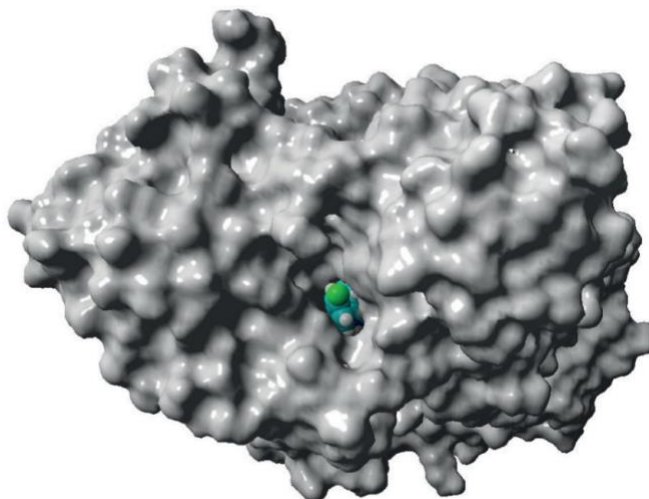
Berdasarkan prediksi aktivitas biologi melalui web server PASS way2drug, diketahui bahwa PIP memiliki beberapa aktivitas biologi yang kemungkinan besar aktif dan berhubungan dengan

AD yaitu sebagai neurotransmitter uptake inhibitor dan sigma *receptor agonist* (Tabel 3). PL hanya memiliki satu aktivitas biologi yang kemungkinan besar aktif, yaitu sebagai sebagai proteasom ATPase inhibitor dengan nilai Pa sebesar 0.762. Sementara itu, TQ memiliki banyak aktivitas biologi yang diprediksi aktif berkaitan dengan AD seperti Apolipoprotein A1 (APOA1) *expression enhancer*, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) stimulant*, *fibrinolytic*, *acylcarnitine hydrolase inhibitor*, *fatty-acyl-CoA synthase inhibitor*, CYP2J2 *substrate* (Tabel 5). Struktur 3D reseptor AChe dan BChE yang telah memenuhi syarat kemudian dipreparasi dengan menghilangkan molekul air dan ligan-ligan yang tidak diperlukan untuk dilanjutkan pada tahap *docking* molekular.

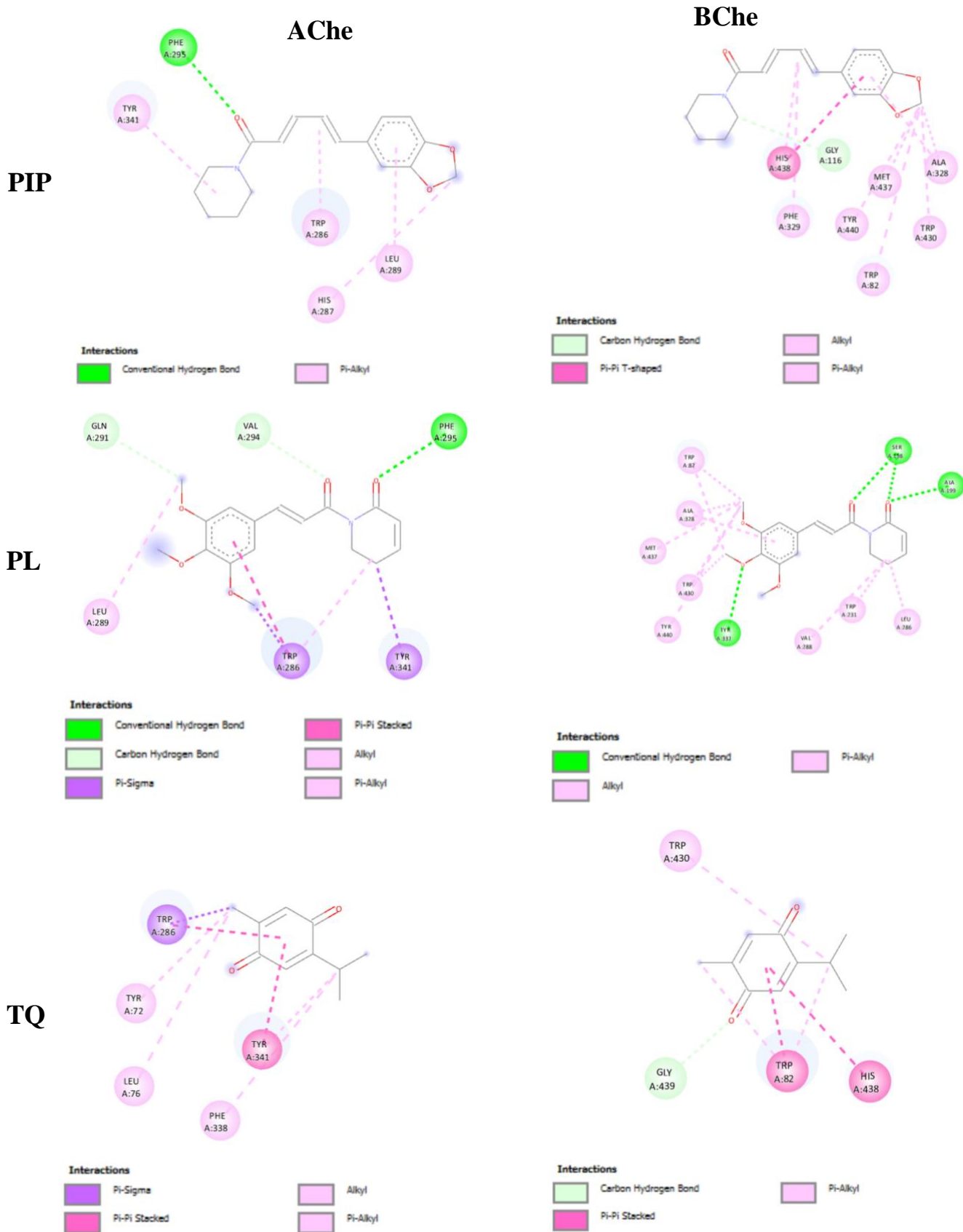
Tabel 2. Hasil Prediksi Fisikokimia dan Farmakokinetik PIP, PL, dan TQ.

		PIP	PL	TQ
Druglikeness (Lipinski's rule of five)		Memenuhi	Memenuhi	Memenuhi
Absorpsi	Solubilitas air	-3.464 log mol/L	-3.288 log mol/L	-1.613 log mol/L
	Permeabilitas Caco2	1.596 log Papp dalam 10^{-6} cm/s (log <i>apparent permeability coefficient</i>)	1.173 log Papp dalam 10^{-6} cm/s	1.271 log Papp dalam 10^{-6} cm/s
	Absorpsi usus	94.444%	94.997%	99.382%
Distribusi	Volume distribusi	0.158 log L/kg	-0.08 log L/kg	-0.026 log L/kg
	Fraksi tidak terikat	0.134 Fu (<i>fraction unbound</i>)	0.227 Fu	0.527 Fu
	Permeabilitas BBB	-0.102 log BB (log $\frac{[\text{obat dalam otak}]}{[\text{obat dalam plasma}]}$)	-0.012 log BB	0.326 log BB
	Permeabilitas CNS	-1.879 log PS (log <i>permeability surface-area product</i>)	2.618 log PS	-2.269 log PS
Metabolisme	Substrat CYP2D6	Tidak	Tidak	Tidak
	Substrat CYP3A4	Ya	Ya	Tidak
	Inhibitor CYP1A2	Tidak	Tidak	Tidak

	Inhibitor CYP2C19	Ya	Tidak	Tidak
	Inhibitor CYP2C9	Tidak	Tidak	Tidak
	Inhibitor CYP2D6	Tidak	Tidak	Tidak
	Inhibitor CYP3A4	Tidak	Tidak	Tidak
Ekskresi	Total pembersihan	0.232 log ml/min/kg	0.215 log ml/min/kg	0.225 log ml/min/kg
	Renal OCT2 substrate	Ya	Tidak	Tidak
Toksisitas	Toksisitas Ames	Ya	Tidak	Tidak
	Toleransi dosis maksimum	-0.38 log m/kg/hari	0.462 log m/kg/hari	0.89 log m/kg/hari
	Inhibitor hEGR I & II	Tidak	Tidak	Tidak
	LD50	2.811 mol/kg	2.449 mol/kg	1.743 mol/kg
	LOAEL	1.51 log mg/kg bb/hari	1.492 log mg/kg bb/hari	2.378 log mg/kg bb/hari
	Hepatoksisitas	Ya	Ya	Ya
	Sensitivitas terhadap kulit	Tidak	Tidak	Ya



Gambar 1. Visualisasi *docking* molekular galantamine (berwarna hijau) dengan AChE (berwarna abu-abu) (Atanasova *et. al.*, 2015).



Gambar 2. Visualisasi hasil *docking* molekular PIP, PL, dan TQ dengan AChE (kiri) dan BChe (kanan).

Interaksi ligan-reseptor yang mendekati keadaan *native*-nya adalah yang memiliki nilai *binding affinity* paling negatif dan nilai RMSD paling rendah (kurang dari 3 Å). Oleh karena itu, tidak semua interaksi hasil *docking* molekular antara PIP, PL, dan TQ dengan AChe dan BChe tersebut valid.

Tabel 5. Hasil *docking* molekular PIP, PL, dan TQ dengan AChe dan BChe.

Pose	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)	RMSD lb.	RMSD ub.	Pose	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)	RMSD lb.	RMSD ub.
AChe-PIP				BChe-PIP			
0	-8.6	0.0	0.0	0	-6.6	0.0	0.0
1	-8.5	15.763	13.773	1	-6.1	2.489	8.727
2	-8.5	8.807	3.019	2	-6.0	2.066	3.01
3	-8.3	8.993	2.704	3*	-6.0	1.426	1.878
4	-7.9	9.123	5.246	4	-5.7	2.336	3.474
5*	-7.7	2.22	1.863	5	-5.7	2.722	8.978
6	-7.7	6.071	5.079	6	-5.5	2.517	3.061
7	-7.5	9.44	4.347	7	-5.4	2.914	8.779
8	-7.5	9.2	3.227	8*	-4.5	1.587	2.332
AChe-PL				BChe-PL			
0	-7.7	0.0	0.0	0	-8.0	0.0	0.0
1*	-7.7	0.115	2.617	1*	-7.9	0.187	2.571
2	-7.6	14.477	17.937	2*	-7.6	1.086	2.833
3	-7.6	13.55	16.534	3	-7.2	2.095	3.236
4	-7.6	13.525	16.378	4	-7.2	3.204	7.397
5	-7.4	2.558	4.329	5	-7.1	3.196	7.632
6	-7.4	14.52	17.951	6	-7.0	2.893	7.759
7	-7.4	2.675	3.538	7	-7.0	2.131	3.509
8	-7.4	1.184	15.575	8	-7.0	2.909	8.225
AChe-TQ				BChe-TQ			
0	-7.0	0.0	0.0	0	-6.6	0.0	0.0
1	-7.0	16.484	19.57	1*	-6.6	1.772	2.626
2	-6.9	16.342	18.57	2	-6.4	1.927	4.345
3	-6.6	2.204	3.458	3	-6.2	1.611	4.178
4	-6.6	1.134	4.614	4	-6.1	3.186	4.69
5*	-6.6	1.219	2.471	5	-6.0	2.373	3.684
6	-6.6	18.092	20.361	6	-5.9	6.203	6.756
7	-6.6	2.228	3.997	7*	-5.8	2.018	2.598
8	-6.4	16.804	19.302	8*	-5.8	1.743	2.377

PEMBAHASAN

PIP, PL, dan TQ terbukti memenuhi kriteria sebagai senyawa obat berdasarkan kriteria *druglikenss Lipinski's rule of five*. Kriteria tersebut adalah memiliki donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5, memiliki akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10, massa molekul tidak lebih dari 500 Da, koefisien partisi (log p) tidak melebihi 5, dan harus

tidak ada pelanggaran ligan (15). Ketiganya juga diketahui lebih mudah larut dalam lemak dibandingkan dalam air yang ditunjukkan oleh nilai *solubilitas air* negatif pada hasil prediksi farmakokimia secara berurutan, yaitu -3.464 log mol/L, -3.288 log mol/L, dan -1.613 log mol/L (Tabel 2). PIP, PL, dan TQ diperkirakan dapat menembus sel epitel usus manusia, sehingga obat dapat dikonsumsi secara oral. Hal ini ditunjukkan oleh nilai log *apparent permeability coefficient*

(Caco2) masing-masing yang lebih dari 0.9 log Papp dalam 10^{-6} cm/s, yaitu secara berturutan sebesar 1.596 log Papp dalam 10^{-6} cm/s, 1.173 log Papp dalam 10^{-6} cm/s, dan 1.271 log Papp dalam 10^{-6} cm/s. Selain itu, prediksi distribusi menunjukkan bahwa kemampuan menembus BBB dari ketiga senyawa tersebut berbeda. Nilai permeabilitas BBB dari ketiga senyawa tersebut secara berurutan adalah -0.102 log BB, -0.012 log BB, dan 0.326 log BB (Tabel 2). Nilai permeabilitas BBB yang kurang dari -0.1 log BB menunjukkan bahwa senyawa sukar menembus BBB. Jadi, TQ paling mudah untuk menembus BBB dibandingkan dengan PIP dan PL. Selain itu, secara berurutan diketahui bahwa ketiga senyawa memiliki nilai fraksi tidak terikat (F_u) sebesar 13.4%, 22.7%, dan 52.7%. Fraksi tidak terikat menunjukkan persentase senyawa yang dapat meninggalkan plasma dan masuk ke dalam jaringan ekstrasvaskular. Terkait dengan volume distribusi, diketahui bahwa volume distribusi PIP rendah, PL rendah, dan TQ tinggi. Semakin tinggi volume distribusi senyawa, maka semakin banyak senyawa yang terdistribusi di jaringan. Jadi, TQ memiliki potensi tinggi untuk mencapai AChE yang terdapat pada jaringan otot dan melekat padanya oleh kolagen yang diikat ke lamina basal (16).

Pada prediksi metabolisme diketahui bahwa PIP dan PL merupakan substrat untuk CYP3A4. CYP3A4 merupakan sitokrom yang memetabolisme hampir 50% obat (17). Jadi, tingkat metabolisme PIP dan PL lebih tinggi dibandingkan TQ. PIP juga diketahui sebagai inhibitor CYP2C19. Hal ini penting untuk diketahui karena jika obat bersifat sebagai inhibitor CYP, maka tingkat toksisitasnya akan meningkat. Selain itu, juga diketahui bahwa ketiga senyawa tidak bersifat mutagenik, namun hepatoksik.

Ketiga senyawa memiliki beberapa aktivitas biologi berkaitan dengan AD yang kemungkinan besar aktif. PIP diprediksi berperan sebagai *neurotransmitter uptake inhibitor*, mencegah AChE memetabolisme ACh sehingga komunikasi antar sel saraf untuk memproses memori baik. Selain itu, PIP juga dapat berperan sebagai *sigma receptor agonist* yang telah diteliti berfungsi sebagai *neuroprotector* dan anti-amnesia melawan neurotoksisitas $A\beta$ (18). PL diprediksi memiliki aktivitas sebagai obat AD untuk aktivitas biologi secara keseluruhan, namun untuk aktivitas biologi yang memiliki $P_a > 0.7$, PL hanya berperan sebagai proteasom ATPase inhibitor. Proteasom berperan untuk mendegradasi protein

yang rusak, sehingga apabila proteasom mengalami disfungsi maka akumulasi protein dalam tubuh akan meningkat termasuk akumulasi amyloid dan hiperfosforilasi protein tau yang merupakan indikator terjadinya AD (19). TQ memiliki banyak aktivitas biologi berpotensi aktif yang berkaitan erat dengan AD, salah satunya adalah APOA1 *expression enhancer* yang dapat menjadi alternatif untuk pengobatan AD. APOA1 merupakan protein yang bertanggungjawab untuk mentransportasikan kelebihan kolesterol dari jaringan perifer ke liver. Telah terbukti bahwa penurunan APOA1 pada biomaterial perifer seperti serum atau plasma terjadi pada pasien AD (20). Selain itu, TQ juga berperan sebagai *Nrf2 stimulant*. *Nrf2* berperan penting dalam mempertahankan homeostasis redoks seluler dan mengatur respons peradangan, selain itu aktivasi *Nrf2* juga memberikan sitoproteksi terhadap peningkatan patologi termasuk penyakit neurodegeneratif (21).

TQ juga berperan sebagai *fibrinolytic*, dimana kadar fibrinogen yang tinggi berkaitan dengan peningkatan risiko AD dan demensia vaskular akibat sifat hemostatik (22). Disisi lain, TQ juga berperan sebagai *acylcarnitine hydrolase inhibitor*, sehingga *carnitine* yang penting untuk metabolisme lipid di otak serta perlindungan terhadap cedera otak dan penyakit neurodegeneratif lain berjalan sebagaimana semestinya (23). Degradasi oksidatif lipid yang telah terbukti terjadi pada beberapa penyakit neurodegeneratif (24), termasuk AD membawa penelitian yang menargetkan *fatty acid synthase* (FASN) sebagai alternatif dalam pengobatan AD. Oleh karena itu, TQ yang memiliki aktivitas sebagai *fatty-acyl-CoA synthase inhibitor* memiliki potensi besar sebagai obat AD. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi lebih lanjut berupa *docking* molekular dan studi *in vitro* maupun *in vivo* untuk membuktikan hal tersebut.

Docking molekular dilakukan antara reseptor AChE dan BChE dengan PIP, PL, dan TQ sebagai ligan. Melalui studi ini diketahui bahwa untuk interaksi dengan AChE, PIP adalah yang paling baik dengan nilai *binding affinity* sebesar -8.6 kkal/mol, disusul oleh PL dan TQ dengan nilai *binding affinity* sebesar -7.7 kkal/mol dan -7.0 kkal/mol. Disisi lain, untuk interaksi dengan BChE, PL adalah yang paling baik dengan nilai *binding affinity* sebesar -8.0 kkal/mol, disusul dengan PIP dan TQ yang memiliki nilai *binding affinity* sama yaitu sebesar -6.6 kkal/mol. Dalam *docking* molekular tidak ada

threshold untuk nilai *binding affinity*. Pemodelan dalam *docking* molekular dapat dikatakan valid apabila nilai RMSD di bawah 3 Å dan optimal apabila di bawah 2 Å (25). Berdasarkan hal tersebut, maka ditemukan bahwa tidak semua pose interaksi ligan-reseptor tersebut valid. Ligan yang berinteraksi baik dalam pose valid untuk ligan-AChe dimiliki oleh PIP, PL, dan TQ dengan nilai *binding affinity* berturut-turut sebesar -7.7 kkal/mol, -7.7 kkal/mol, dan -6.6 kkal/mol. Nilai *binding affinity* interaksi ligan-BChe oleh PL, TQ, dan PIP berturut-turut besarnya adalah -7.9 kkal/mol, -6.6 kkal/mol, dan -6.0 kkal/mol. Hasil visualisasi interaksi PIP, PL, dan TQ dengan BChE menunjukkan bahwa ketiganya dapat membentuk ikatan dengan beberapa residu asam amino dari BChE. Jadi, ketiganya mempunyai peluang untuk dikembangkan dalam penanganan AD.

KESIMPULAN

Dari studi ini disimpulkan bahwa PIP, PL, dan TQ memenuhi syarat dan berpotensi sebagai obat AD. Melalui studi *docking* molekular diketahui bahwa ketiganya dapat berinteraksi baik dengan reseptor. Nilai *binding affinity* TQ dengan AChE dan BChE lebih kecil daripada PIP dan PL, namun dari hasil prediksi fisikokimia, farmakokinetik dan aktivitas biologi, TQ mudah menembus BBB dan memiliki banyak aktivitas biologi berpotensi aktif yang terkait dengan AD. Berdasarkan hasil-hasil tersebut, sehingga TQ berpotensi lebih tinggi untuk dipelajari lebih lanjut secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk penanganan AD.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia. Geneva [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 3];(Global action plan on the public health response to dementia):2–34. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
- [2] Suryoadji KA, Faruqi M, Aryaputra VJ. Underweight Nutritional Status as a Predictor of Mortality in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Study. *Cermin Dunia Kedokteran* [Internet]. 2022 May 25 [cited 2022 Jul 20];49(6):338–40. Available from: <http://103.13.36.125/index.php/CDK/article/view/1884>.
- [3] Riederer F. Donanemab in early Alzheimer's Disease. *Journal fur Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* [Internet]. 2021 Mar 13 [cited 2022 Jun 13];22(3):142–3. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2100708>.
- [4] Roy A. Role of medicinal plants against Alzheimer's disease. *Int J Complement Altern Med* [Internet]. 2018 Jul 12 [cited 2022 Jun 16];Volume 11(Issue 4). Available from: <https://medcraveonline.com/IJCAM/IJCAM-11-00398.php>.
- [5] Chougale S, Kumar D, Khan A, Zehra S, Ali A. Treatment of Alzheimer's disease by natural products. Vol. 38, *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Turkey)*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2021. p. 634–44.
- [6] Habtemariam S. molecules Natural Products in Alzheimer's Disease Therapy: Would Old Therapeutic Approaches Fix the Broken Promise of Modern Medicines? 2019 [cited 2022 Jun 17]; Available from: www.mdpi.com/journal/molecules.
- [7] Tiwari A, Mahadik KR, Gabhe SY. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. *Med Drug Discov*. 2020 Sep 1;7:100027.
- [8] Liang J, Ziegler JD, Jahraus B, Orlik C, Blatnik R, Blank N, et al. Piperlongumine Acts as an Immunosuppressant by Exerting Prooxidative Effects in Human T Cells Resulting in Diminished TH17 but Enhanced Treg Differentiation. *Front Immunol*. 2020 Jun 12;11:1172.
- [9] Imran M, Rauf A, Khan IA, Shahbaz M, Qaisrani TB, Fatmawati S, et al. Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Oct 1;106:390–402.
- [10] Wang C, Cai Z, Wang W, Wei M, Kou D, Li T, et al. Piperine attenuates cognitive impairment in an experimental mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019 Aug 1;70:147–55.
- [11] Wiemann J, Karasch J, Loesche A, Heller L, Brandt W, Csuk R. Piperlongumine B and analogs are promising and selective inhibitors for acetylcholinesterase. *Eur J Med Chem*. 2017;139:222–31.

- [12] Cascella M, Bimonte S, Barbieri A, del Vecchio V, Muzio MR, Vitale A, et al. Dissecting the potential roles of *Nigella sativa* and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease. Vol. 10, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
- [13] Jia CY, Li JY, Hao GF, Yang GF. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. Vol. 25, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2020. p. 248–58.
- [14] Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. Vol. 94, *Archives of Toxicology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 3671–722.
- [15] Kumar Jha A, Prajapati V, Prajapati C, Tyagi M, Khare N, Abdul A. MOLECULAR DOCKING OF ROSMARINIC ACID AGAINST HUMANIN FOR THE POSSIBLE TREATMENT OF ALZHEIMER' DISEASE. [cited 2022 Jul 8]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/357173201>.
- [16] Blotnick-Rubin E, Anglister L. Fine localization of acetylcholinesterase in the synaptic cleft of the vertebrate neuromuscular junction. *Front Mol Neurosci*. 2018 Apr 19;11:123.
- [17] Zhou XY, Hu XX, Wang CC, Lu XR, Chen Z, Liu Q, et al. Enzymatic activities of CYP3A4 allelic variants on quinine 3-hydroxylation in vitro. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY):591.
- [18] Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee S, Kaushal N, Matsumoto RR. Sigma-1 Receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a Hypothesis of Sigma-1 Receptors as Amplifiers of Neurodegeneration and Neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 5];964:133. Available from: [/pmc/articles/PMC5500918/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35500918/)
- [19] Bonet-Costa V, Pomatto LCD, Davies KJA. The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2022 Jun 7];25(16):886. Available from: [/pmc/articles/PMC5124752/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/274752/)
- [20] Endres K. Apolipoprotein A1, the neglected relative of Apolipoprotein e and its potential role in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Jun 7];16(11):2141–8. Available from: https://journals.lww.com/nrronline/Fulltext/2021/16110/Apolipoprotein_A1,_the_neglected_relative_of.3.aspx.
- [21] Osama A, Zhang J, Yao J, Yao X, Fang J. Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Res Rev*. 2020 Dec 1;64:101206.
- [22] Sun Y, Li Q, Liu W, Zhang B. Relationship between fibrinogen level and its regulatory gene with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of International Medical Research* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jun 7];48(2):1–12. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300060520902578>.
- [23] Wilkins JM, Trushina E. Application of metabolomics in Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2018 Jan 12;8(JAN):719.
- [24] Ates G, Goldberg J, Currais A, Maher P. CMS121, a fatty acid synthase inhibitor, protects against excess lipid peroxidation and inflammation and alleviates cognitive loss in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2020 Sep 1;36:101648.
- [25] Listyani TA, Herowati R, Djalil AD. View of Molecular Docking Analysis of Derivate Phthalimide Compounds as Non-Nucleosida HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 22]. Available from: <http://ejournal.setiabudi.ac.id/ojs/index.php/farmasi-indonesia/article/view/445/449>.