

SINTESIS, KARAKTERISASI STRUKTUR, DAN KAJIAN MOLECULAR DOCKING SENYAWA 4'-METOKSI FLAVONOL SEBAGAI INHIBITOR MAIN PROTEASE (M^{Pro}) SARS-CoV-2

Ihsan Ikhtiarudin¹, Nesa Agistia¹, Neni Frimayanti¹, Enda Mora¹, Rahma Dona¹, Nofriyanti¹
Rosnita Dewi Rahmawati¹, dan Adel Zamri²

¹ Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru

ABSTRAK

Main protease (M^{Pro}) merupakan salah satu protein yang memiliki peran penting dalam proses replikasi virus SARS-CoV-2. Beberapa studi *in silico* dan *in vitro* telah menunjukkan bahwa senyawa flavonoid baik alami maupun sintesis memiliki potensi yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai antivirus SARS-CoV-2. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis senyawa 4'-metoksi flavonol dan mengeksplorasi potensinya sebagai inhibitor M^{Pro} SARS-CoV-2. Sintesis dilakukan menggunakan senyawa awal 2'-hidroksi-4-metoksi kalkan melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada (AFO) dengan metode pengadukan (*stirring method*). Selanjutnya, kajian *molecular docking* dilakukan menggunakan struktur kristal M^{Pro} SARS-CoV-2 yang diunduh dari website RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 6M2N). Hasil sintesis senyawa 4'-metoksi flavonol diperoleh rendemen produk sebesar 37,72 % dan struktur produk hasil sintesis telah dikonfirmasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, dan ¹H NMR. Selanjutnya, hasil kajian *molecular docking* menunjukkan bahwa senyawa 4'-metoksi flavonol dapat membentuk ikatan hidrogen dengan dua residu penting pada sisi aktif 6M2N, yaitu Glu166 dan Gln189, dengan nilai energi bebas ikatan sebesar -7,13 kcal/mol dan nilai RMSD sebesar 1,45. Hasil kajian ini menunjukkan bahwa senyawa 4'-metoksi flavonol dapat terikat dengan lebih mudah pada sisi aktif M^{Pro} SARS-CoV-2 dibandingkan dengan baicalein sebagai senyawa flavonoid pembanding yang telah terbukti secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas proteolitik M^{Pro} SARS-CoV-2.

Kata Kunci :

Flavonol, *in silico*,
docking, SARS-CoV-2,
6M2N

PENDAHULUAN

Corona Virus Infection Disease 2019 (COVID-19) pertama kali dilaporkan terjadi di Wuhan, Cina, pada Desember 2019. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi *Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2* (SARS-CoV-2) dan telah memakan banyak korban jiwa dalam beberapa tahun terakhir [1]. Di Indonesia, kasus infeksi virus ini pertama kali dilaporkan pada awal Maret 2020 [2]. Update situasi COVID-19 di website kemkes.go.id hingga 5 November 2021 melaporkan bahwa angka kematian akibat COVID-19 di Indonesia telah mencapai 143.500 jiwa atau sekitar 3,38 % dari jumlah jiwa yang teridentifikasi positif COVID-19. Dalam hal ini, Indonesia termasuk dalam kategori transmisi komunitas [3].

Berbagai cara telah dilakukan oleh para peneliti untuk mengatasi COVID-19. Diantaranya adalah dengan mengembangkan berbagai jenis vaksin dan antivirus. Salah satu pendekatan awal yang dapat digunakan dalam pencarian obat COVID-19 adalah dengan mencari senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor *main protease* (M^{Pro}) atau disebut juga *3-chymotrypsin-like protease* (3CLPro), dikarenakan enzim ini memiliki peran penting dalam proses replikasi virus SARS-CoV-2 [4-5]. Oleh karena itu, banyak peneliti tertarik untuk menggali potensi berbagai molekul organik, baik yang berasal dari bahan alam maupun sintesis untuk dikembangkan sebagai inhibitor SARS-CoV-2 dengan menargetkan M^{Pro} tersebut.

Salah satu golongan senyawa bahan alam yang menarik banyak perhatian peneliti untuk dikaji potensinya sebagai inhibitor M^{Pro} SARS-CoV-2

adalah senyawa flavonoid. Senyawa ini dikenal memiliki segudang potensi aktivitas biologis. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa senyawa flavonoid jenis flavonol seperti quercetin, dan jenis flavon seperti hispidulin dan cirsimaritin berdasarkan kajian *in silico* memiliki kemampuan untuk berikatan dengan residu asam amino pada sisi aktif M^{Pro} SARS-CoV-2 (PDB ID 6LU7), dengan nilai afinitas ikatan masing-masing sebesar -7,5; -7,3; dan -7,2 kcal/mol [6]. Selain itu, berdasarkan kajian *in vitro*, senyawa flavonoid baicalein juga dilaporkan memiliki kemampuan menghambat aktivitas proteolitik M^{Pro} SARS-CoV-2 dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,94 μM [5] dan juga terhadap SARS-CoV-1 dengan nilai IC₅₀ sebesar 1,18 μM [7], sedangkan bentuk glikosidanya (baicalin) dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan yang sedikit lebih rendah dengan nilai IC₅₀ sebesar 6,41 μM [5]. Kemudian baicalein juga telah dilaporkan memiliki aktivitas antivirus pada sel yang terinfeksi SARS-CoV-2 dengan nilai EC₅₀ sebesar 1,69 μM [7].

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk mengeksplorasi potensi aktivitas biologis dari suatu senyawa flavonoid sintetik sebagai inhibitor M^{Pro} SARS-CoV-2 secara *in silico*. Sintesis senyawa flavonol tersebut dilakukan menggunakan senyawa awal berupa analog 2'-hidroksi kalkan melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada (AFO) [8]. Selanjutnya, eksplorasi terhadap potensi aktivitas biologis senyawa tersebut dilakukan dengan pendekatan kimia komputasi, yaitu melalui kajian *molecular docking* terhadap struktur kristal M^{Pro} SARS-CoV-2.

Masuk 09-11-2021

Revisi 19-01-2022

Diterima 08-02-2022

DOI: 10.20956/mff.v26i1.18652

Korespondensi

Ihsan Ikhtiarudin

ihsanikhtiarudin@stifar-riau.ac.id

Copyright

© 2022 Majalah Farmasi

Farmakologi Fakultas Farmasi ·
Makassar

Diterbitkan tanggal

30 April 2022

Dapat Diakses Daring Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



Pendekatan komputasi dapat digunakan untuk memprediksi bioaktivitas dari suatu senyawa sebelum dilakukan analisis percobaan di laboratorium. Metode ini memiliki keunggulan, diantaranya dapat mengurangi penggunaan alat dan bahan yang berlebihan serta dapat menghemat dalam pembiayaan percobaan [9]. Dalam hal ini, kami menggunakan struktur kristal M^{Pro} SARS-CoV-2 yang terikat dengan suatu senyawa flavonoid baicalein yang sebelumnya telah terbukti dapat menghambat aktivitas M^{Pro} SARS-CoV-2 berdasarkan kajian *in vitro* [7].

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam tahapan sintesis yaitu timbangan analitik, *freezer*, *magnetic stirrer*, corong Buchner, lampu UV 254 dan 366 nm (Camag), alat pengukur titik leleh (Stuart SMP 11), HPLC (Shimadzu Lc solution), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800i), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu, IR Spirit, A224158), Spektrometer NMR (Agilent, 500 MHz), dan beberapa peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium kimia STIFAR Riau.

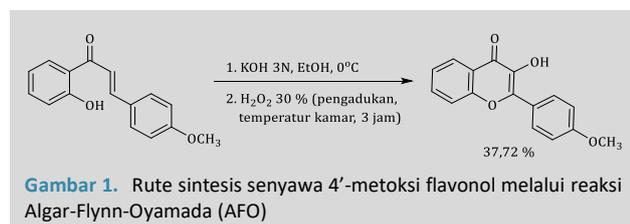
Peralatan yang digunakan dalam tahapan kajian *molecular docking* yaitu komputer LG Intel(R) Core (TM) i7-8700, CPU 3.20 GHz dengan RAM 16,0 GB dan dilengkapi dengan perangkat lunak ChemDraw Professional 15.0, Discovery Studio Visualizer (DSV) 2021, dan *Molecular Operating Environment* (MOE) 2020.0101 (Chemical Computing Group). Semua perangkat lunak dijalankan dengan sistem operasi Windows 10 Pro 64 bit.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain 2'-hidroksi-4-metoksi kalkon (Produk Praktikum Sintesa Obat di STIFAR Riau), hidrogen peroksida 30% (Merck), potasium hidroksida (Merck), sodium hidroksida (Merck), etanol absolut (Merck), air suling (Bratoco), plat KLT silika gel GF 254 (Merck), dan indikator universal (Merck).

Prosedur Kerja

Sintesis senyawa 4'-metoksi flavonol

Sintesis senyawa 4'-metoksi flavonol sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 1 dilakukan melalui reaksi AFO dengan memodifikasi metode sintesis yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya [10].



Sebanyak 20 mmol (5,08 g) senyawa 2'-hidroksi-4-metoksi kalkon ditempatkan dalam erlenmeyer ukuran 250 mL, kemudian ditambahkan dengan 100 mL etanol absolut dan 20 mL larutan potasium hidroksida 3N. Campuran tersebut kemudian didinginkan hingga temperatur 0°C di dalam *freezer*. Setelah temperatur yang diinginkan tercapai, ke dalam campuran tersebut kemudian ditambahkan 16 mL hidrogen peroksida 30% dan campuran reaksi diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 3 jam. Setelah reaksi selesai, ke dalam campuran produk ditambahkan sebanyak 24 ml HCl 3N dingin secara bertahap sehingga terbentuk endapan. Campuran produk didinginkan selama 12 jam dan kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 40 menggunakan corong Buchner, dicuci dengan

aquades dingin dan *n*-heksana dingin, lalu dibiarkan kering dalam desikator untuk mendapatkan *crude product* 4'-metoksiflavonol. *Crude product* kemudian direkristalisasi dengan etanol panas untuk mendapatkan senyawa 4'-metoksi flavonol murni. Produk murni yang diperoleh ditimbang beratnya dan dihitung % rendemennya.

Karakterisasi sifat fisika dan karakterisasi struktur produk hasil sintesis

Produk yang diperoleh diukur titik lelehnya menggunakan Stuart *melting point apparatus* (SMP 11). Kemudian dilakukan analisis kemurnian dengan HPLC fase terbalik menggunakan kolom Shim-Pack VP-ODS (150 x 4,6) mm dengan metode gradien elusi, laju alir 1 mL / menit, dan deteksi dilakukan menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 355 nm. Adapun perbandingan komposisi fase gerak yang digunakan selama waktu analisis dapat dilihat pada Tabel 1. Selanjutnya, struktur produk hasil sintesis dikarakterisasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis dalam pelarut metanol (konsentrasi 5 ppm) dan juga dengan penambahan pereaksi geser larutan sodium hidroksida 2N pada rentang panjang gelombang 200 – 500 nm. Pengukuran spektrum FT-IR dilakukan pada rentang bilangan gelombang 400 – 4600 cm⁻¹ di Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, dan pengukuran spektrum ¹H NMR dilakukan pada rentang pergeseran kimia 0-14 ppm dalam pelarut CDCl₃ di Institut Teknologi Bandung.

Tabel 1. Perbandingan komposisi fase gerak pada analisis HPLC produk hasil sintesis

Waktu (menit)	Komposisi fase gerak (%)	
	Metanol	Air
0,01	80	20
2,00	80	20
10,00	95	5
12,00	95	5
14,00	80	20
15,00	80	20
15,02	Stop	

Kajian *molecular docking* senyawa 4'-metoksi flavonol sebagai inhibitor M^{Pro} SARS-CoV-2

Preparasi struktur kristal protein dan penentuan sisi aktif protein

Struktur kristal M^{Pro} diunduh dari situs rcsb.org dengan kode PDB ID 6M2N. Struktur kristal tersebut kemudian dipreparasi menggunakan aplikasi DSV 2021 dan MOE 2020. Dalam hal ini, chain A dipilih untuk studi berdasarkan literatur sebelumnya [11]. Molekul air, chain B, C, dan D dihilangkan menggunakan aplikasi DSV 2021. Residu asam amino pada chain A yang berinteraksi dengan baicalein (ligan bawaan) diamati dengan DSV 2021 dan dicatat. Selanjutnya, struktur protein tersebut dipreparasi menggunakan MOE 2020. Dalam hal ini, molekul baicalein (ligan bawaan) dihilangkan, kemudian *forcefield* diatur menjadi *Chemistry at HARvard Molecular Mechanics 32* (CHARMM32), *fix hydrogens*, *fix charges*, dan dilanjutkan dengan preparasi menggunakan menu *QuickPrep* yang tersedia pada MOE 2020 (protonasi dilakukan menggunakan *protonate3D* dan RMS *Gradient* diatur menjadi 0,001 kcal/mol/Å). Struktur yang telah dipreparasi ini kemudian disimpan dalam format PDB untuk digunakan sebagai reseptor.

Isolasi dan preparasi ligan bawaan, Penandaan sisi aktif protein, dan *redocking* baicalein ke sisi aktif protein

Molekul baicalein (ligan bawaan) diisolasi dari struktur kristal 6M2N dan dipreparasi dengan *Merck molecular force field* (MMFF94x), *fix hydrogens*, *fix charges*, *fix O-H bond length*, *optimally orient OH groups*, dan *Gradient* diatur menjadi 0,0001 RMS kcal/mol/Å. File struktur baicalein

yang telah dipreparasi ini kemudian disimpan dalam *database ligand*. Selanjutnya, dilakukan penandaan residu asam amino pada sisi aktif protein yang telah dipreparasi sebagai *dummy atom* menggunakan menu *site finder* yang tersedia pada aplikasi MOE 2020. Dalam hal ini, *site* yang ditandai sebagai *dummy atoms* adalah *site 1* dan *force field* diatur menjadi CHARMM27. Setelah itu, masuk ke menu dock, lalu *dummy atoms* dipilih sebagai *site* dan MDB file yang berisi struktur baicalein (ligan bawaan) yang telah dipreparasi kemudian dipilih sebagai ligan. *Placement* dan *refinement poses* masing-masing diatur menjadi 100 dan 10. Kemudian setelah memilih folder penyimpanan hasil *docking*, klik *Run* dan tunggu hingga proses *docking* selesai. Setelah itu, mode pengikatan baicalein hasil *redocking* yang paling sesuai dengan mode pengikatan baicalein bawaan dipilih dan disimpan untuk divisualisasikan secara 2D dan 3D. Nilai RMSD dan kesamaan asam amino yang berinteraksi dengan keduanya diamati untuk menentukan validitas protokol *docking* yang telah dipilih. Selain itu, juga dilakukan *overlay* untuk membandingkan pose pengikatan baicalein hasil *redocking* dengan baicalein ligan bawaan.

Preparasi struktur ligan, *docking* senyawa 4'-metoksi flavonol, dan visualisasi hasil *docking*

Struktur 2D senyawa 4'-metoksi flavonol digambarkan menggunakan aplikasi ChemDraw dan struktur 3D nya dipreparasi menggunakan aplikasi MOE 2020 mengikuti prosedur preparasi baicalein. File struktur ligan yang telah dipreparasi ini kemudian disimpan dalam *database ligand*. *Docking* senyawa 4'-metoksi flavonol dilakukan dengan mengikuti prosedur *redocking* baicalein. File hasil *docking* diperoleh dalam bentuk tabel yang berisi nilai *binding free energy* (S, kcal/mol) dan nilai RMSD dalam format MDB. Kompleks protein-ligan hasil *docking* disimpan dalam format PDB. Kemudian pose pengikatan dan interaksi protein-ligan divisualisasikan dalam bentuk gambar 2D dan 3D menggunakan aplikasi DSV 2021. Nilai energi bebas pengikatan, RMSD, residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan dan jenis interaksi yang terjadi ditampilkan dalam bentuk tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis senyawa 4'-metoksi flavonol melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada (AFO) dengan metode pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Mekanisme reaksi sintesis senyawa 4'-metoksi flavonol diawali dengan perebutan hidrogen fenolik pada 2'-hidroksi-4-metoksi kalkon oleh basa, sehingga terbentuk ion fenoksida. Kemudian, penambahan hidrogen peroksida menyebabkan terjadinya ikatan rangkap α , β pada molekul 2'-hidroksi-4-metoksi kalkon sehingga terbentuk intermediet epoksida (oxirane). Selanjutnya, ion fenoksida bertindak sebagai nukleofil dengan menyerang atom karbon β pada cincin oxirane yang reaktif sehingga terjadi pemutusan ikatan C_{β} -O oxirane. Dalam hal ini, atom oksigen oxirane digantikan oleh atom oksigen fenoksida, sehingga dihasilkan senyawa flavanonol yang kemudian akan segera teroksidasi oleh hidrogen peroksida menjadi flavonol. Jika oksidasi flavanonol menjadi flavonol tidak berlangsung sempurna, maka kemungkinan produk akan bercampur dengan flavanonol. Jika penyerangan ion fenoksida terjadi pada karbon α oxirane, maka produk samping yang akan dihasilkan adalah auron [12]. Dalam hal ini, proporsi flavonol yang dihasilkan dipengaruhi oleh struktur analog 2'-hidroksikalkon sebagai senyawa awal dan juga dipengaruhi oleh metode sintesis yang digunakan. Pada penelitian ini, *crude product* yang diperoleh belum murni sehingga perlu dilakukan rekristalisasi. Rekristalisasi dilakukan dengan pelarut etanol absolut panas, sehingga diperoleh produk

murni dengan rendemen 37,72 %. Berdasarkan hasil tersebut, rendemen produk yang dihasilkan pada penelitian ini masih belum memuaskan dan masih lebih kecil jika dibandingkan dengan rendemen yang diperoleh pada penelitian sebelumnya. Sehingga masih diperlukan optimasi metode sintesis supaya diperoleh rendemen yang lebih baik. Peneliti sebelumnya telah melaporkan sintesis senyawa yang sama dengan metode stirrer namun menggunakan jenis basa dan pelarut yang berbeda. Pada penelitian ini, basa yang digunakan adalah potassium hidroksida dan reaksi berlangsung dalam pelarut etanol. Sedangkan pada penelitian sebelumnya, basa yang digunakan adalah sodium hidroksida dan reaksi berlangsung dalam pelarut metanol. Selain itu, perbedaan lainnya terletak pada pH yang ditargetkan pada proses penambahan asam klorida ke dalam campuran produk setelah reaksi selesai. Pada penelitian ini, asam klorida ditambahkan hanya sampai pada pH 7, sedangkan penambahan asam klorida pada metode sebelumnya dilakukan sampai pH 2 [10]. Beberapa perbandingan mengenai metode sintesis dan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dan sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3

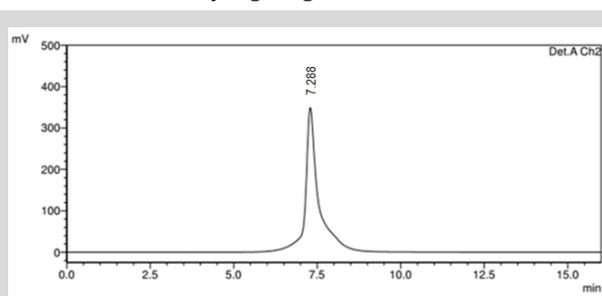
Tabel 2. Perbandingan metode sintesis penelitian ini dan penelitian sebelumnya

Metode	Perbedaan metode			pH
	Basa	Pelarut	Temperatur	
Penelitian sebelumnya [10]	NaOH 4M	Metanol	Campuran diaduk pada temperatur ruang	2
Penelitian ini	KOH 3N	Etanol	Didinginkan hingga temperatur 0 °C, baru kemudian diaduk pada temperatur ruang	7

Tabel 3. Perbandingan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dan penelitian sebelumnya

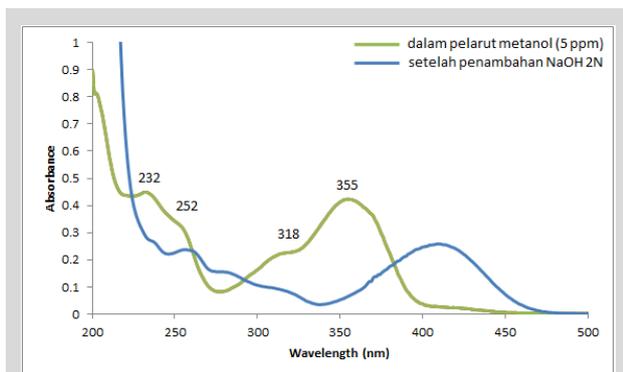
Hasil	Perbedaan hasil		
	Warna	Rendemen	Titik leleh (°C)
Penelitian sebelumnya [10]	Endapan putih	74,60 %	234-236
Penelitian ini	Endapan kuning	47,20 % (sebelum rekristalisasi), 37,72 % (setelah rekristalisasi)	158-159

Hasil pengukuran titik leleh produk hasil rekristalisasi menunjukkan bahwa senyawa produk tersebut memiliki titik leleh 158-159°C. Jarak leleh yang tajam ini ($\leq 2^{\circ}\text{C}$) menunjukkan bahwa produk yang diperoleh memiliki kemurnian yang baik. Semakin tajam jarak leleh suatu padatan maka akan semakin tinggi pula tingkat kemurnian padatan tersebut. Padatan yang belum murni biasanya memiliki jarak leleh yang lebar. Selain itu, hasil analisis kemurnian dengan HPLC terhadap produk juga menunjukkan puncak tunggal pada t_R 7,288 menit, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2, yang mengindikasikan bahwa produk memiliki kemurnian yang sangat baik.



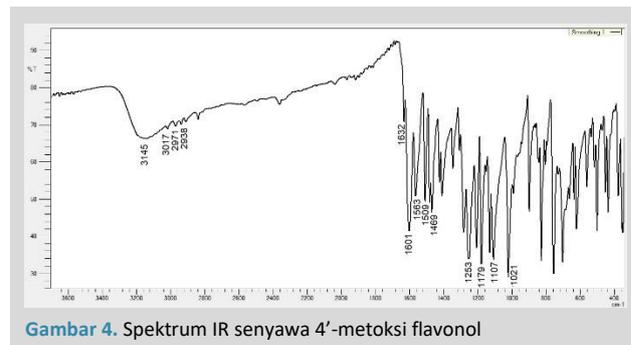
Gambar 2. Kromatogram HPLC senyawa 4'-metoksi flavonol

Setelah produk hasil sintesis dipastikan murni, selanjutnya dilakukan karakterisasi struktur melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FTIR, dan ^1H NMR. Pemeriksaan Spektrum UV-Vis dilakukan untuk mengidentifikasi kehadiran kromofor atau jenis sistem konjugasi yang khas pada suatu struktur molekul organik. Spektrum UV-Vis senyawa 4'-metoksi flavonol dalam pelarut metanol sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 3 menunjukkan serapan pada panjang gelombang maksimum 232, 252 (sh), 318 (sh) dan 355 nm, dengan nilai absorbansi berturut-turut sebesar 0,449; 0,332; 0,227; dan 0,423. Berdasarkan literatur, spektrum UV suatu senyawa flavonol dengan gugus 3-OH bebas memiliki ciri khas yang ditandai dengan munculnya pita I pada daerah panjang gelombang 350 – 385 nm dan pita II pada daerah panjang gelombang 250 – 280 nm [13]. Dalam hal ini, pita I senyawa tersebut muncul pada panjang gelombang 355 nm, yang dihasilkan oleh sistem konjugasi 4'-metoksi sinamoil, sedangkan pita II muncul pada panjang gelombang 252 nm, yang dihasilkan oleh sistem konjugasi benzoil. Serapan yang dihasilkan oleh sistem konjugasi 4'-metoksi sinamoil muncul pada panjang gelombang yang lebih besar dikarenakan sistem konjugasinya lebih panjang dibandingkan dengan sistem konjugasi benzoil. Semakin panjang suatu sistem konjugasi, maka energi yang dibutuhkan untuk terjadinya transisi elektronik menjadi lebih kecil, sehingga serapannya akan muncul pada panjang gelombang yang lebih besar. Selanjutnya, penambahan pereaksi geser larutan sodium hidroksida 2N juga menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik. Dalam hal ini, serapan maksimum pita I yang awalnya muncul pada panjang gelombang 355 nm menjadi bergeser ke panjang gelombang 409 nm.



Gambar 3. Spektrum UV-Vis senyawa 4'-metoksi flavonol dalam pelarut metanol sebelum dan setelah penambahan pereaksi geser.

Pengukuran spektrum FT-IR dilakukan untuk mengidentifikasi kehadiran gugus fungsi atau jenis ikatan tertentu yang terdapat pada molekul organik. Spektrum FT-IR senyawa 4'-metoksi flavonol sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4 menunjukkan pita serapan melebar pada bilangan gelombang 3145 cm^{-1} . Pita serapan tersebut dihasilkan oleh gugus hidroksi yang terikat pada cincin C senyawa flavonol. Kemudian, pita serapan pada bilangan gelombang 3017 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C-H aromatik dan pita serapan pada bilangan gelombang 2971-2938 cm^{-1} menunjukkan vibrasi regang dari ikatan C-H alifatik gugus metoksi. Selanjutnya, pita serapan pada bilangan gelombang 1632 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari gugus C=O keton terkonjugasi, dan beberapa pita serapan yang muncul pada bilangan gelombang 1601, 1563, 1509, dan 1469 cm^{-1} menunjukkan kehadiran ikatan C=C aromatik. Selain itu, beberapa pita serapan yang muncul pada bilangan gelombang 1253, 1179, 1107, dan 1021 cm^{-1} menunjukkan kehadiran beberapa jenis ikatan C-O eter dan C-O alkohol yang terdapat pada struktur molekul produk [14].

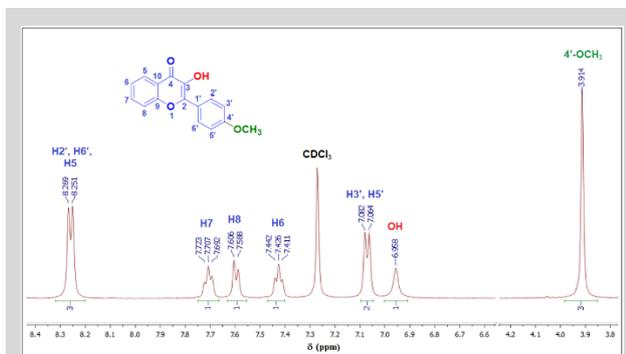


Gambar 4. Spektrum IR senyawa 4'-metoksi flavonol

Pengukuran spektrum ^1H NMR dilakukan untuk menentukan jumlah dan jenis lingkungan kimia proton yang terdapat pada suatu molekul organik. Dalam hal ini, pengukuran spektrum ^1H -NMR dilakukan menggunakan pelarut CDCl_3 pada frekuensi 500 MHz, dimana sinyal proton CDCl_3 muncul pada pergeseran kimia 7,27 ppm. Hasil pengukuran spektrum ^1H NMR menunjukkan bahwa produk yang diperoleh memiliki jumlah proton yang sesuai dengan struktur produk yang diinginkan (12 proton). Spektrum ^1H -NMR senyawa 4'-metoksi flavonol menunjukkan pergeseran kimia yang khas jika dibandingkan dengan spektrum ^1H NMR senyawa awalnya. Gugus hidroksi pada analog 2'-hidroksi kalkon dalam pelarut CDCl_3 akan memberikan sinyal singlet yang khas pada pergeseran kimia δ 12-13 ppm [15]. Sehingga, ketidakhadiran sinyal tersebut pada spektrum ^1H NMR produk menunjukkan bahwa gugus hidroksi (2'-OH) pada senyawa awal tersebut telah berhasil mengalami siklisasi membentuk cincin heterosiklik flavonoid [16]. Selain itu, kekhasan lainnya adalah munculnya puncak singlet pada pergeseran kimia δ 6,96 ppm dengan integrasi 1H yang menunjukkan kehadiran proton dari gugus OH yang terikat pada karbon C3 cincin heterosiklik tersebut [8]. Selanjutnya, satu-satunya sinyal proton alifatik yang muncul adalah sinyal dari proton metoksi pada daerah pergeseran kimia proton alifatik δ 3,91 ppm. Hal ini menjadi penentu bahwa pada cincin heterosiklik C produk terdapat ikatan rangkap (kromen) yang menjadi pembeda antara struktur senyawa flavonol (flavon-3-ol) dengan flavanonol.

Sinyal-sinyal proton aromatik dapat diamati pada pergeseran kimia δ 8,26 ppm dengan integrasi 3H yang menunjukkan pergeseran kimia dari proton aromatik yang paling tidak terperisai pada senyawa 4'-metoksi flavonol. Sinyal tersebut dihasilkan oleh proton H5 dengan puncak *doublet* (1H), dimana sinyal proton tersebut mengalami *overlapping* dengan sinyal *doublet* (2H) dari proton H2'/H6' ($J = 8,3$ Hz). Kemudian sinyal proton aromatik yang muncul pada pergeseran kimia δ 7,71 ppm dengan integrasi 1H menunjukkan pergeseran kimia dari proton H7 pada cincin kromen dengan puncak *triplet* ($J = 7,9$ Hz). Dalam hal ini, konstanta *coupling* sebesar 7,9 Hz tersebut merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H7 dengan proton H6 dan H8). Kemudian, puncak pada pergeseran kimia δ 7,60 ppm dengan nilai integrasi 1H dihasilkan oleh proton H8 pada cincin kromen, dengan puncak *doublet* ($J = 8,5$ Hz). Dalam hal ini, konstanta *coupling* sebesar 8,5 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H8 dengan proton H7. Selanjutnya, puncak pada pergeseran kimia δ 7,43 ppm dengan integrasi 1H menunjukkan pergeseran kimia dari proton H6 dengan puncak *triplet* ($J = 7,7$ Hz). Dalam hal ini, konstanta *coupling* sebesar 7,7 Hz tersebut juga merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H6 dengan proton H5 dan H7. Selain itu, munculnya 2 buah puncak *doublet* masing-masing dengan integrasi 2H pada pergeseran kimia 8,26 ppm (H2'/H6') dan 7,07 ppm (H3'/H5') juga menjadi ciri khas

bahwa gugus metoksi yang terdapat pada cincin B terletak pada posisi para. Dengan demikian, secara keseluruhan hasil analisis spektroskopi terhadap produk tersebut menunjukkan bahwa struktur produk yang diperoleh pada penelitian ini telah sesuai dengan struktur 4'-metoksi flavonol. Sinyal-sinyal dari proton alifatik, proton 3-OH, dan proton-proton aromatik yang muncul pada spektrum ^1H NMR senyawa 4'-metoksi flavonol tersebut masing-masing ditandai dengan warna hijau, merah, dan biru, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Penandaan sinyal-sinyal proton pada spektrum ^1H NMR senyawa 4'-metoksi flavonol.

Selanjutnya, kajian *molecular docking* dilakukan untuk mengeksplorasi potensi senyawa 4'-metoksi flavonol sebagai inhibitor M^{Pro} SARS-CoV-2. Dalam hal ini, struktur kristal yang digunakan adalah struktur kristal M^{Pro} SARS-CoV-2 yang terikat dengan baicalein dan diunduh pada website rcsb.org (PDB ID 6M3N). Alasan pemilihan struktur kristal ini dikarenakan pada struktur kristal tersebut terikat senyawa baicalein yang merupakan suatu senyawa flavonoid alami yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya berpotensi secara *in silico* berdasarkan kajian *molecular docking* dan juga telah terbukti secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas proteolitik M^{Pro} SARS-CoV-2 [7]. Hal ini sesuai dengan senyawa yang ingin dikaji pada penelitian ini yaitu senyawa flavonol yang juga termasuk golongan senyawa flavonoid.

Tabel 4. Perbandingan interaksi baicalein hasil *redocking* dengan baicalein ligan bawaan

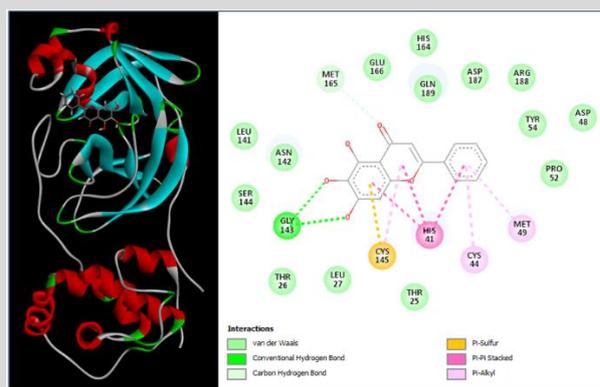
Interaksi baicalein	
Ligan bawaan	Hasil <i>redocking</i>
-	Thr25 ^c
-	Thr26 ^c
Leu27 ^c	Leu27 ^c
His41 ^e	His41 ^e
Cys44 ^f	Cys44 ^f
Asp48 ^c	Asp48 ^c
Met 49 ^f	Met49 ^f
Pro52 ^c	Pro52 ^c
Tyr54 ^c	Tyr54 ^c
Leu141 ^c	Leu141 ^c
Asn142 ^c	Asn142 ^c
Gly143 ^a	Gly143 ^a
Ser144 ^a	Ser144 ^a
Cys145 ^d	Cys145 ^d
His163 ^c	-
His164 ^c	His164 ^c
Met165 ^b	Met165 ^b
Glu166 ^a	Glu166 ^a
Asp187 ^c	Asp187 ^c
Arg188 ^c	Arg188 ^c
Gln189 ^c	Gln189 ^c

Keterangan:

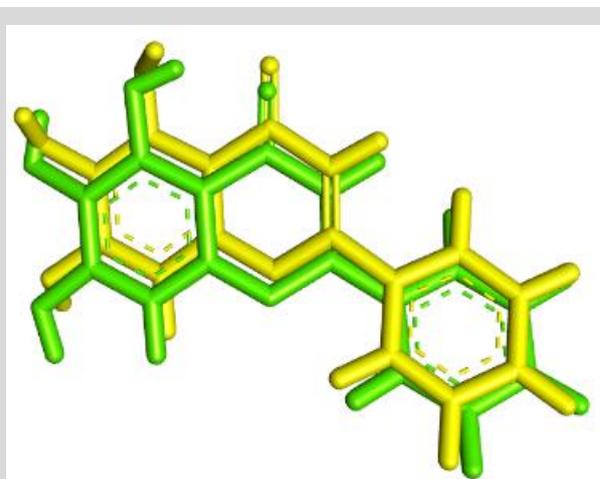
a = ikatan hidrogen, b = ikatan hidrogen karbon, c = interaksi van der Waals, d = interaksi phi sulfur, e = interaksi phi-phi stacked, f = interaksi phi alkyl.

Sebelum dilakukan *docking* senyawa 4'-metoksi flavonol ke 6M3N, terlebih dahulu dilakukan *redocking* senyawa baicalein sebagai ligan bawaan ke sisi aktif 6M3N untuk memvalidasi protokol *docking* yang dipilih. Proses ini diawali

dengan mengisolasi struktur baicalein yang terikat pada struktur kristal protein dan kemudian dilanjutkan dengan preparasi dan optimasi struktur ligan dan protein. Selanjutnya, dilakukan *redocking* struktur baicalein ke sisi aktif yang telah ditandai. Perbandingan kesamaan residu asam amino yang berinteraksi dengan baicalein hasil *redocking* dengan baicalein ligan bawaan dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil *redocking* baicalein tersebut menunjukkan kemiripan residu asam amino yang tinggi dengan baicalein ligan bawaan. Dalam hal ini, terdapat 18 residu asam amino yang sama yang berinteraksi dengan baicalein hasil *redocking*. Kemiripan lainnya yang dapat diamati adalah baicalein hasil *redocking* juga dapat membentuk dua ikatan hidrogen dengan residu asam amino Gly143. Dalam hal ini, residu asam amino tersebut berikatan hidrogen dengan dua gugus OH pada senyawa baicalein, yaitu gugus OH pada C6 dan C7 kromen sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 6. Kedua interaksi ini juga terjadi pada baicalein ligan bawaan. Namun, terdapat perbedaan interaksi dengan residu asam amino Ser144 dan Glu166, dimana baicalein ligan bawaan juga berikatan hidrogen dengan kedua residu tersebut, namun hasil *redocking* hanya menunjukkan interaksi van der Waals. Selanjutnya dilakukan *overlay* pose pengikatan baicalein hasil *redocking* dengan baicalein ligan bawaan untuk memastikan kemiripan tersebut sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 7. Hasil *overlay* juga menunjukkan bahwa pose pengikatan keduanya sangat mirip. Selain itu, berdasarkan hasil *redocking* diperoleh nilai energi bebas pengikatan senyawa baicalein adalah sebesar -6,66 kcal/mol dengan nilai RMSD 1,45, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan nilai RMSD tersebut dapat disimpulkan bahwa protokol *docking* yang dipilih telah valid.



Gambar 6. Visualisasi 3D dan 2D hasil *redocking* senyawa baicalein



Gambar 7. *Overlay* pose pengikatan senyawa baicalein hasil *redocking* (hijau) dengan baicalein ligan bawaan (kuning)

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis haturkan kepada Pusat Penelitian dan Pengabdian (P3M) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFAR) Riau yang telah membiayai penelitian ini melalui hibah dosen pemula STIFAR Riau tahun 2021 dengan surat perjanjian pelaksanaan kegiatan penelitian No. 12b.15.P3M.STIFAR.VIII.2021.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 94 [Internet]. Geneva: WHO; 2021. Available from: www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200423-sitrep-94-covid-19.pdf
2. Aisyah DN, Mayadewi CA, Diva H, Kozlakidis Z, Siswanto, Adisasmito W. A spatial-temporal description of the SARS-CoV-2 infections in Indonesia during the first six months of outbreak. *PLoS ONE*. 2020;15(12):e0243703. DOI:10.1371/journal.pone.0243703
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemkes RI). Situasi Terkini Perkembangan *Coronavirus Disease* (COVID-19) 5 November 2021 [internet]. Jakarta: Kemkes RI; 2021. Available from: www.infeksiemerging.kemkes.go.id/document/situasi-terkini-perkembangan-coronavirus-disease-covid-19-5-november-2021/view
4. Gyebe GA, Ogunro OB, Adegunloye AP, Ogunyemi OM, Afolabi SO. Potential inhibitors of coronavirus 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro): an *in silico* screening of alkaloids and terpenoids from African medicinal plants. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020;39(9):3396-3408. DOI:10.1080/07391102.2020.1764868
5. Su Hx, Yao S, Zhao Wf, Li Mj, Liu J, Shang Wj, Xie H, Ke Cq, Hu Hc, Gao Mn, Yu Kq, Liu H, Shen Js, Tang W, Zhang Lk, Xiao Gf, Ni L, Wang Dw, Zuo Jp, Jiang Hl, Bai F, Wu Y, Ye Y, Xu Yc. Anti-SARS-CoV-2 activities *in vitro* of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41:1167–1177. DOI:10.1038/s41401-020-0483-6
6. Sekiou O, Bouziane I, Frissou N, Bouslama Z, Honcharova O, Djemel A, Benselhouh A. In-Silico Identification of Potent Inhibitors of COVID-19 *Main protease* (M^{pro}) from Natural Products. *Int J Biochem Physiol*. 2020;5(3):000189. DOI:10.23880/ijbp-16000189
7. Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 *main protease* as drug target. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;30(17):127377. DOI:10.1016/j.bmcl.2020.127377
8. Ikhtiarudin I, Frimayanti N, Teruna HY, Zamri A. Microwave-Assisted Synthesis, *Molecular docking* Study and *In vitro* Evaluation of Halogen Substituted Flavonols Against P388 Murine Leukemia Cells. *Applied Science and Technology*. 2017;1(1):375-381.
9. Frimayanti N, Mora E, Anugrah R. Study of *Molecular docking* of Chalcone Analogue Compounds as Inhibitors for Liver Cancer Cells HEPG2. *Comp Eng App Journal*. 2018; 7(2):137-147. DOI:10.18495/COMENGAPP.V7I2.260
10. Dias TA, Duarte CL, Lima CF, Proença MF, Pereira-Wilson C. Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. *Eur J Med Chem*. 2013;65:500-510. DOI:10.1016/j.ejmech
11. Mohamed NM, Ali EMH, and Asmaa M. AboulMag, AM. Ligand-based design, *molecular* dynamics and ADMET studies of suggested SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors. *RSC Adv*. 2021;11:4523-4538. DOI:10.1039/d0ra10141a
12. Bennett M, Burke, AJ, O'Sullivan, W.I. Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction. *Tetrahedron*. 1996;52(20):7163-7178.
13. Markham KR. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
14. Nandiyanto ABD, Oktiani R, Ragadhita, R. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indonesian Journal of Science & Technology*. 2019;4(1):97-118. DOI:10.17509/ijost.v4i1.15806
15. Ikhtiarudin I, Lelani, Zamri A, Teruna HY, Yuharmen. Sintesis dan Uji Toksisitas Senyawa Analog Kalkon Turunan 2'-Hidroksiasetofenon dan Halobenzaldehid. *Photon: Jurnal Sain dan Kesehatan*. 2014;5(1):57-63. DOI: 10.37859/jp.v5i1.194
16. Zamri A, Teruna HY, Ikhtiarudin I. The Influences of Power Variations on Selectivity of Synthesis Reaction of 2'-Hydroxychalcone Analogue under Microwave Irradiation. *Molekul*. 2016;11(2):299-307. DOI: 10.20884/1jm.2016.11.2.220.

Sitasi artikel ini: Ikhtiarudin I, Agistia N, Frimayanti N, Mora E, Dona R, Nofriyanti, Rahmawati RD, dan Zamri A. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian *Molecular Docking* Senyawa 4'-Metoksi Flavonol sebagai Inhibitor *Main Protease* (M^{pro}) SARS-Cov-2 MFF 2022;26(1):8-14