

MEKANISME ANTI THROMBIN DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) MELALUI PENGHAMBATAN PROTEIN THROMBIN DAN HUMAN VKOR DENGAN STUDI IN SILICO

Larissa Radhiana Gayanthi¹, Dini Sri Damayanti^{2*}, Andri Tilaqza³

^{1,2}Prodi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

³Prodi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Stroke adalah penyakit defisit neurologis yang disebabkan karena gangguan vaskularisasi otak akibat thrombus atau pecahnya pembuluh darah. Daun sirsak mengandung senyawa aktif golongan flavonoid, alkaloid, tannin, dan terpenoid yang diketahui memiliki potensi sebagai trombolitik melalui penghambatan pembentukan thrombin. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui afinitas senyawa aktif daun sirsak sebagai trombolitik melalui penghambatan protein thrombin (1ZGI) dan protein VKOR (6WV6) secara *in silico*.

Metode: Penelitian secara *in silico* menggunakan metode molecular *docking*, prediksi fisikokimia dan farmakokinetik. Protein target menggunakan protein thrombin (1ZGI) dan human vkor (6WV6) senyawa aktif daun sirsak diperoleh melalui literatur dan website dr.duke. Skrining senyawa daun sirsak sebagai trombolitik menggunakan website *PASS online* proses *docking* menggunakan aplikasi pyrx. Nilai energi bebas dan kemiripan ikatan residu asam amino digunakan sebagai indikator afinitas ligan terhadap protein, dan visualisasi *docking* menggunakan biovia Analisa data secara deskriptif analitik.

Hasil: Hasil skrining didapatkan 22 senyawa aktif memiliki nilai Pa (*probability activity*) >0,5. hasil doking ligan terhadap protein thrombin terbaik yaitu procyanidin (ΔG -9.5 kkal/mol) dengan kesamaan residu asam amino (45%), adapun terhadap protein *human VKOR* yaitu coclaurine ΔG -8.9 kkal/mol dengan persamaan residu asam amino (87%) Hasil prediksi fisikokimia dan farmakokinetik didapatkan bahwa coclaurine mempunyai kelarutan dan bioavailabilitas yang tinggi namun bersifat hepatotoksik.

Kesimpulan: Senyawa aktif daun sirsak yaitu coclaurine diprediksi berpotensi menghambat protein thrombin dan human VKOR dan dapat dikembangkan sebagai obat oral. Namun pemberian jangka Panjang masih perlu dikaji lebih lanjut karena adanya potensi hepatotoksik.

Kata Kunci: Trombolitik, Anti thrombin, *Annona muricata*; *in silico*.

*Korespondensi: Dini Sri Damayanti

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur Indonesia 65144

+62-341-57892

dinisridamayanti@unisma.ac.id

PREDICTION OF ANTI THROMBIN MECHANISM OF SOURSOP LEAVE PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS (*Annona muricata*) THROUGH THROMBIN INHIBITION AND HUMAN VKOR INHIBITION IN SILICO STUDY

Larissa Radhiana Gayanthi¹, Dini Sri Damayanti^{2*}, Andri Tilaqza³

^{1,2}Prodi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

³Prodi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Stroke is a neurological deficit degenerative disease caused by disruption of brain vascularization due to thrombus or rupture blood vessels. Soursop leaves contain active compounds of flavonoids, alkaloids, tannins, and terpenoids which are known to have potential as thrombolytic by inhibit thrombin formation. This study aims to determine the affinity of active compounds of soursop leaves as thrombolytic by inhibit thrombin formation through inhibition of thrombin protein (1ZGI) and *human VKOR* protein (6WV6) *in silico*.

Method: In silico research using molecular docking methods, physicochemical and pharmacokinetic predictions. Target protein using thrombin protein (1ZGI) and human VKOR (6WV6) active soursop leaf compounds were obtained through literature and the dr.duke website. Screening of soursop leaf compounds as thrombolytics using the *PASS online* website, the docking process using the pyrx application. Free energy values and similarity of amino acid residue bonds are used as indicators of ligand affinity to proteins, and docking visualization using biovia. Data analysis is a descriptive analytical.

Results: The screening results obtained 22 active compounds with Pa (Probability activity) values >0.5. The best ligand docking results against thrombin protein are procyanidin (ΔG -9.5 kkal/mol) with similarity of amino acid residues (45%), while against human VKOR protein, namely coclaurine (ΔG -8.9 kkal/mol) with similarity of amino acid residues (87%). The result of physicochemical and pharmacokinetic predictions showed that coclaurine has high solubility and bioavailability but is hepatotoxic.

Conclusion: Coclaurine is predicted have potential to inhibit protein thrombin and *human VKOR*, but requires close supervision because is hepatotoxic.

Keywords: Thrombolytic, Anti thrombin, *Annona muricata*; *in silico*.

*Korespondensi: Dini Sri Damayanti

dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Stroke adalah kondisi yang terjadi secara mendadak akibat gangguan pada sistem saraf, yang dapat disebabkan masalah dalam aliran darah yang mengalir menuju otak. Gangguan ini dapat dipicu oleh adanya penyumbatan atau bekuan darah (trombus) yang menghambat aliran darah yang menuju ke otak, kondisi ini dikenal sebagai stroke iskemik.⁽¹⁾ Stroke adalah salah satu penyakit penyebab kematian terbesar setelah hipertensi dan kanker. Pada tahun 2007, terdapat jumlah penderita stroke di negara Indonesia awalnya tercatat sebanyak 8,3 orang per 1.000 penduduk, kemudian terjadi peningkatan sebanyak 12,1 orang per 1.000 jumlah populasi penduduk pada tahun 2013⁽³⁾.

Pada keadaan stroke iskemik, sel trombosit dapat menjadi indikator yang memperburuk keadaan penderita dikarenakan trombosit menyebabkan terbentuknya intravaskular thrombus. Pada saat terjadi kerusakan pembuluh darah trombosit akan mengaktifkan tromboplastin atau trombokinase memiliki peran penting dalam proses pembentukan thrombin, dengan melalui bantuan ion kalsium serta vitamin K, prothrombin ini akan diubah menjadi trombin. kemudian, trombin ini akan mengubah bentuk fibrinogen menjadi jaringan serat fibrin. sehingga dapat memperbaiki kerusakan pada pembuluh darah⁽²⁵⁾. Thrombus yang terbentuk secara berlebih akan memicu terjadinya hambatan aliran darah pada pembuluh darah⁽⁴⁾.

Senyawa aktif *oxazolopyridine inhibitor 21* dapat berikatan dengan protein thrombin dan memiliki efek antikoagulan. Dengan demikian trombosit menjadi inaktif sehingga mengurangi resiko terjadinya pembentukan thrombus. Adapun phenindione merupakan senyawa yang dapat berikatan dengan *human VKOR (Vitamin K epoxide reductases)* yang berperan penting dalam proses terjadinya pembekuan darah. Ikatan tersebut menyebabkan menghambat pembentukan vitamin 2,3 epoksida menjadi vitamin K. Rendahnya vitamin K akan menurunkan pembentukan thrombin dari prothrombin sehingga menurunkan resiko terbentuknya thrombus. Thrombin merupakan protein yang berikatan dengan *oxazolopyridine inhibitor 21* yang memiliki efek antikoagulan dan dapat berikatan dengan sisi aktif thrombin secara mandiri tanpa perantara reseptor, sehingga thrombin yang terbentuk tidak dapat mengaktifkan kerja trombosit yang lain sehingga mengurangi resiko terjadinya pembentukan thrombus akibat trombosit yang berlebih⁽¹⁾.

Human VKOR (Vitamin K epoxide reductases) merupakan enzim yang juga memiliki peran penting pada proses terjadinya bekuan darah. VKOR (*Vitamin K epoxide reductases*) ini dapat membantu merubah vitamin 2,3-epoksida menjadi vitamin K yang

menjadi indikator yang membantu perubahan prothrombin menjadi thrombin, Ketika kerja protein ini dihambat maka pembentukan thrombin akan berkurang sehingga resiko terbentuknya thrombus akibat trombosit yang berlebih akan berkurang⁽⁵⁾. Terapi pasien yang memiliki penyakit stroke akibat sumbatan bekuan darah hanya dapat diberikan obat golongan antikoagulan dan trombolitik⁽⁶⁾.

Annona muricata merupakan salah satu tanaman herbal sering dimanfaatkan karena memiliki berbagai aktifitas farmakologis⁽⁷⁾. Daun sirsak mampu mencegah pembentukan thrombus melalui mekanisme penurunan kadar kolesterol darah, dan menghambat factor intrinsik pada jalur pembekuan darah pada tikus model hiperkolesterolemia. Belum adanya penelitian yang membahas mekanisme senyawa aktif daun sirsak menghambat protein thrombin dan protein *human VKOR (Vitamin K epoxide reductases)* merupakan alasan dilakukan penelitian ini. Penelitian bertujuan memprediksi mekanisme anti thrombin daun sirsak melalui penghambatan protein thrombin dan *human VKOR (Vitamin K epoxide reductases)* secara *in silico*.

Daun sirsak berpotensi sebagai agen anti thrombin dan antikoagulan dengan cara menghambat faktor intrinsik, berdasarkan hasil studi yang dilakukan secara langsung pada tubuh tikus hidup (*in vivo*). Penelitian yang menggunakan tikus sebagai model percobaan hiperkolesterolemia menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak bersama dengan obat simvastatin dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah⁽⁹⁾. Akan tetapi, sampai sekarang masih belum ditemukan studi yang mengeksplorasi potensi daun sirsak sebagai agen anti thrombin melalui penghambatan protein thrombin dan protein *human VKOR (Vitamin K epoxide reductase)* menggunakan pendekatan *in silico*, serta belum diketahui mekanisme molekuler senyawa aktifnya dalam peran tersebut. Dengan demikian, penelitian yang dilakukan ini ditujukan untuk memprediksi mekanisme aksi daun sirsak (*Annona muricata*) yang berfungsi selaku agen anti thrombin melalui metode berbasis *in silico*, dengan menargetkan penghambatan protein thrombin dan *human VKOR*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Studi ini dilaksanakan menggunakan metode berbasis *in silico* atau menggunakan pendekatan berbasis komputer. Zat aktif yang terdapat dalam daun sirsak diperoleh melalui *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical* serta melalui studi pustaka, kemudian dilakukan proses penyaringan senyawa menggunakan situs *PASS online*. Protein thrombin (kode IZGI) dan *human VKOR* (kode 6WV6) diambil dari *protein data bank*. Molecular docking digunakan untuk

mengevaluasi afinitas molekul senyawa aktif yang terdapat dalam daun sirsak (*Annona muricata*) pada protein target dengan bantuan aplikasi pyrx. Senyawa aktif yang didapatkan dari hasil penambatan yang berpotensi sebagai agen trombolitik selanjutnya dilakukan proses prediksi farmakokinetik menggunakan situs pkCSM dan prediksi fisikokimia menggunakan situs SwissADME. Penelitian dilakukan di Fakultas Ilmu Kedokteran pada Universitas Islam Malang pada bulan Januari 2025.

Alat dan Bahan

Penelitian yang dilakukan ini dilaksanakan dengan bantuan perangkat laptop sebagai alat bantu, yakni laptop Asus yang dilengkapi dengan prosesor Intel Core i7-8550U, VGA Intel UHD Graphics 620, serta RAM sebesar 8GB. Sistem operasi yang digunakan adalah Microsoft Windows 11 Home Single Language. Proses molecular docking dilakukan dengan bantuan perangkat lunak PyRx yang diperoleh melalui situs <http://vina.scripps.edu/>. Untuk tahap persiapan dan visualisasi molekul, digunakan aplikasi Discovery Studio Visualizer versi 21.1.0.20298 yang diunduh dari <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> serta perangkat lunak PyMOL. Data mengenai senyawa aktif diperoleh dari basis data fitokimia dan etnobotani Dr. Duke (<https://phytochem.nal.usda.gov/>), sementara struktur kimia senyawa aktif daun sirsak dapat diperoleh dengan diunduh dari situs PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Proses skrining awal terhadap senyawa aktif dilakukan memakai layanan PASS online (<https://www.way2drug.com/passonline/>). Adapun protein target yang digunakan adalah thrombin dan human VKOR yang telah terikat dengan ligan asli, dan data struktur protein tersebut diperoleh melalui database Protein Data Bank (PDB) di <http://rcsb.org>.

Skrining Potensi Aktivitas Trombolitik

Tahap skrining diawali dengan menggunakan *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*, dimana diperoleh 84 senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirsak. Senyawa-senyawa tersebut kemudian diseleksi lebih lanjut untuk menilai potensi aktivitas trombolitiknya menggunakan layanan PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) online yang dapat diakses melalui situs (<https://www.way2drug.com>). Prediksi yang dihasilkan oleh PASS online didasarkan pada analisis hubungan diantara bentuk kimia dan aktivitas biologis dari beragam senyawa organik yang berpotensi sebagai agen trombolitik. Dalam proses ini, format SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) dari masing-masing senyawa yang sebelumnya diperoleh dari basis data PubChem dimasukkan ke dalam sistem PASS. Selanjutnya, pengguna memilih opsi "*get prediction*" agar memperoleh nilai Pa (*probability to be active*). Nilai Pa dalam rentang 0,5 hingga 0,7 mengindikasikan bahwa senyawa tersebut menunjukkan adanya potensi untuk dikembangkan sebagai kandidat obat, sementara nilai Pa di atas 0,7 mengarah pada kemungkinan besar bahwa suatu senyawa dapat menunjukkan proses biologis yang setara dengan obat yang telah ada.⁽¹⁰⁾

Dari hasil proses skrining terhadap 84 senyawa aktif yang terdapat dalam daun sirsak, sebanyak 22 senyawa teridentifikasi memiliki potensi sebagai agen trombolitik dan fibrinolitik, yang berperan dalam melisis trombus. Penilaian potensi ini dilakukan melalui platform PASS online, dengan pemilihan senyawa didasarkan pada angka Pa (*probability to be active*) yang melebihi 0,5 serta menunjukkan aktivitas sebagai fibrinolitik dan trombolitik. Selanjutnya, 22 senyawa terpilih tersebut akan dianalisis lebih lanjut untuk memprediksi sifat fisikokimia dan farmakokinetiknya, serta dilakukan proses docking dengan protein target.⁽¹¹⁾

Tabel 1 Skrining Senyawa Fitokimia Sebagai Trombolitik Dengan PASS Online

No	Ligan	SMILES	PA	Potensi
1.	Amyl – hexanoate	CCCCC(=O)OCCCCC	0,745	Fibrinolitik
			0,684	Antagonis reseptor fibrinogen
			0,629	Antithrombotik
2.	Anomuricine	COC1=CC=C(C=C1)CC2C3=CC(=C(C(=C3CCN2)O)OC)OC	0,789	Fibrinolitik
3.	Anomurine	COC1=CC=C(C=C1)CC2C3=CC(=C(C(=C3CCN2)OC)OC)OC	0,767	Fibrinolitik
4.	Ascorbic – acid	C([C@@H])([C@@H])C(=C(C(=O)O)O)O)O	0,625	Fibrinolitik
5.	Caffeic – acid	C1=CC(=C(C=C1/C=C/C(=O)O)O)O	0,750	Fibrinolitik
6.	Citrulline	C(C[C@@H])(C(=O)O)N)CNC(=O)N	0,673	Antagonis reseptor fibrinogen

7.	Coclaurine	<chem>COC1=C(C=C2[C@@H](NCCC2=C1)CC3=CC=C(C=C3)O)O</chem>	0,876	Fibrinolitik
8.	Coreximine	<chem>COC1=C(C=C2[C@@H]3CC4=CC(=C(C=C4C3CCC2=C1)OC)O)O</chem>	0,605	Fibrinolitik
9.	Galactomannan	<chem>C([C@@H]1[C@@H]([C@@H]([C@H]([C@H](O1)OC[C@@H]2[C@H]([C@@H]([C@@H]([C@@H]([C@@H](O2)O)O)O)[C@H]3[C@H]([C@H]([C@@H]([C@H]([C@@H]([C@H](O3)CO)O)O)O)O)O)O)O</chem>	0,720	Antithrombotik
			0,829	Fibrinolitik
10.	Gaba	<chem>C(CC(=O)O)CN</chem>	0,829	Fibrinolitik
			0,647	Antagonis reseptor fibrinogen
11.	Geranyln – caproate	<chem>CCCCC(=O)OC/C=C(\C)/CCC=C(C)C</chem>	0,588	Fibrinolitik
			0,032	Antagonis reseptor fibrinogen
			0,503	Thrombolitik
12.	Isocitric – acid	<chem>C(C(C(C(=O)O)O)C(=O)O)C(=O)O</chem>	0,646	Fibrinolitik
13.	Lignoceric – acid	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>	0,780	Fibrinolitik
			0,665	Antagonis reseptor fibrinogen
14.	Malic acid	<chem>C(C(C(=O)O)O)C(=O)O</chem>	0,696	Fibrinolitik
			0,616	Antagonis reseptor fibrinogen
15.	Methyl – hexanoate	<chem>CCCCC(=O)OC</chem>	0,721	Fibrinolitik
			0,656	Antagonis reseptor fibrinogen
16.	Muricine	<chem>COC1=C(C2=C(CC3C4=C2C(=C(C=C4CCN3)OC)O)C=C1)O</chem>	0,640	Fibrinolitik
17.	Mystric – acid	<chem>C[C@@]12CC[C@@H]3[C@@]([C@H]1C=C4=C5CC(CC[C@@]5(CC[C@@]24C)C(=O)O)(C)C)(C(=O)C[C@@H](C3(C)C)O)C</chem>	0,780	Fibrinolitik
			0,665	Antagonis reseptor fibrinogen
			0,621	Antithrombotik
18.	P – coumaric acid	<chem>C1=CC(=CC=C1/C=C/C(=O)O)O</chem>	0,749	Fibrinolitik
19.	Panthothenic – acid	<chem>CC(C)(CO)[C@H](C(=O)NCCC(=O)O)O</chem>	0,656	Antagonis reseptor fibrinogen
20.	Procyanidin	<chem>C1C(C(OC2=CC(=CC(=C21)O)O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)OC4(C(C(C5=C(C=C(C=C5O4)O)O)O)C6=CC(=C(C=C6)O)O</chem>	0,760	Fibrinolitik
21.	Reticuline	<chem>CN1CCC2=CC(=C(C=C2[C@@H]1CC3=CC(=C(C=C3)OC)O)O)OC</chem>	0,732	Fibrinolitik
22.	Stearic acid	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>	0,780	Fibrinolitik
			0,665	Antagonis reseptor fibrinogen
			0,621	Antithrombotik

Keterangan: Data hasil skrining terhadap 22 kandungan senyawa aktif dari daun sirsak (*Annona muricata*) dilakukan menggunakan PASS Online, dengan pemilihan aktivitas biologis berdasarkan nilai Pa yang lebih dari 0,5

Preparasi Protein Target dan Ligand

Protein target thrombin serta human VKOR dipersiapkan (dipreparasi) terlebih dahulu sebelum proses docking, dengan cara menghilangkan molekul air dan ligan pengganggu menggunakan aplikasi PyMOL,

kemudian disimpan dalam bentuk file format PDB. Molekul-molekul tersebut disimpan dalam satu dokumen. Sesudah itu dilakukan proses pembersihan, molekul diberi suatu muatan serta ikatan *hidrogen polar only*.

Native ligand yang terikat pada protein target telah dipisahkan terlebih dahulu, kemudian protein tersebut dibersihkan dari molekul air serta ligan lain yang dapat mengganggu, menggunakan aplikasi PyMOL. Setelah proses pembersihan, struktur dari protein disimpan menggunakan format PDB. Sementara itu, preparasi ligan dilakukan dengan menambahkan muatan serta atom hidrogen polar memanfaatkan software PyMOL.⁽¹⁴⁾

Validasi Metode *Molecular Docking*

Proses validasi dilakukan melalui metode mendocking ulang ligan asli (*native ligand*) dari protein target, yang dikenal sebagai redocking. Validasi ini bertujuan untuk mengevaluasi akurasi hasil docking dengan membandingkan dengan angka RMSD (Root Mean Square Deviation) antara posisi ligan asli sebelum dan sesudah docking menggunakan tool dock.RMSD (15). Angka RMSD yang dianggap bagus ialah kurang dari 3,0 Å. Terdapat tiga kategori penilaian RMSD dalam docking: pertama, sangat baik jika $RMSD \leq 2$ Å; kedua, bisa diterima jika berada antara 2 Å hingga 3 Å; dan ketiga, dianggap buruk jika $RMSD \geq 3$ Å.⁽¹⁶⁾

Penambatan Molekul Senyawa Aktif Daun *Annona muricata* terhadap thrombin dan human VKOR.

Ligan asli (*native ligand*) dari protein thrombin, yaitu oxazolopyridine inhibitor 21, dan dari protein human VKOR, yaitu phenindione, digunakan sebagai kontrol obat dalam penelitian ini. Sebelum proses docking dimulai, dilakukan pengaturan grid box yang disesuaikan dengan ukuran dan posisi ligan asli pada protein target. Setelah penyesuaian grid box selesai, proses docking dilaksanakan menggunakan aplikasi PyRx. Hasil docking disimpan dalam format PDB. Tahap akhir dari proses ini adalah analisis konformasi dari hasil docking terbaik, yang kemudian divisualisasikan untuk mengidentifikasi interaksi residu asam amino dengan memanfaatkan software Discovery Studio.

Teknik Analisis Data

Data dari hasil interaksi docking kemudian dikaji secara deskriptif dilihat dari nilai energi ikatan bebas (ΔG) serta kesamaan residu asam amino. Nilai ΔG digunakan sebagai indikator untuk menilai tingkat afinitas senyawa aktif terhadap protein target. Sementara itu, persamaan residu asam amino dengan suatu ligan asli (*native ligand*) membuktikan bahwa suatu bahan aktif daun sirsak berinteraksi terhadap lokasi pengikatan (*binding site*) yang serupa dengan obat pembanding dalam protein target yang identik atau sama.

Prediksi ADMET dan Sifat Fisikokimia

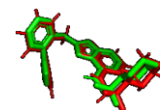
Prediksi ADMET (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas) dilakukan menggunakan situs pkCSM

(<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsms>) dengan memasukkan data struktur dalam bentuk SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) yang diperoleh dari situs PubChem. Format SMILES dari senyawa kemudian disalin ke dalam platform SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) dan dianalisis dengan menekan tombol "Run". Sementara itu, analisis sifat fisikokimia senyawa juga dilakukan melalui SwissADME. adapun prosesnya yaitu dengan cara menempelkan SMILES yang sudah di copy dari senyawa aktif yang diperoleh dan dipilih melalui situs *website pubchem* kemudian klik pada "Provide a SMILES string", selanjutnya meng klik opsi ADMET untuk memulai proses menganalisis⁽¹⁸⁾

HASIL DAN ANALISA DATA

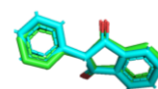
Hasil Validitas Metode *Molecular Docking*

Hasil penambatan Kembali atau redocking antara protein thrombin dengan *native ligand* oxazolopyridine inhibitor 21 menunjukkan nilai RMSD sebesar 0,554 Å, seperti ditampilkan pada Gambar 1. Karena nilai tersebut ≤ 2 Å, maka proses docking dianggap valid. Sementara itu, redocking protein human VKOR dengan ligan asli phenindione menghasilkan nilai RMSD sebesar 0,393 Å, sebagaimana terlihat pada Gambar 2. Nilai ini juga berada dalam kisaran ≤ 2 Å, sehingga docking dinyatakan valid (*acceptable*)⁽⁶⁾.



Gambar 1: Validasi native ligan Oxazolopyridin inhibitor 21

Keterangan: Visualisasi *native ligan* oxazolopyridine inhibitor 21 menunjukkan warna merah sebelum proses docking dan berubah menjadi hijau setelah docking



Gambar 2: Validasi native ligan Phenindione

Keterangan: Gambar visualisasi *native ligan* phenindione sebelum proses docking yaitu berwarna hijau sedangkan setelah docking divisualisasikan dengan warna biru.

Tabel 2 Hasil validasi Metode

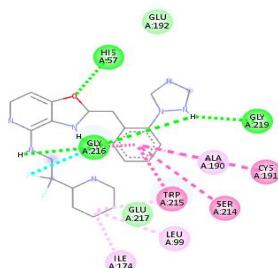
Native ligand	Jumlah Pengulangan	Nilai RMSD
Oxazolopyridin inhibitor 21	3 kali running docking	0,554 Å
Phenindione	3 kali running docking	0,393 Å

Keterangan: Hasil data validasi metode diperoleh dengan membandingkan *native ligan* sebelum dan sesudah proses docking, yang dianalisis dengan aplikasi PyMOL.

Penambatan Molekul Senyawa Aktif Daun Sirsak dan Oxazolopyridin inhibitor 21 terhadap Protein Thrombin

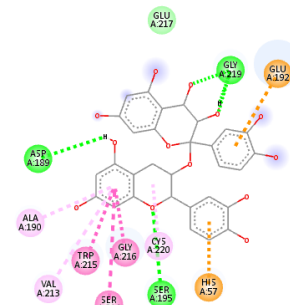
Nilai energi ikatan bebas (ΔG) inhibitor oxazolopyridine 21 terhadap protein thrombin

tercatat sebesar -10,1 kkal/mol, dengan interaksi melibatkan sebelas residu asam amino. Dari hasil docking terhadap 22 senyawa aktif yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata*), ditemukan lima zat senyawa yang menunjukkan angka ΔG lebih rendah dari -7 kkal/mol. Kelima senyawa tersebut adalah procyanidin, muricinine, reticuline, coclaurine, dan galactomannan, yang semuanya menunjukkan afinitas pengikatan yang baik terhadap protein target. Tingkat kemiripan residu asam amino dengan ligan kontrol (obat perbandingan) masing-masing adalah: procyanidin 45%, muricinine 36%, reticuline 45%, coclaurine 36%, dan galactomannan 36%. Berdasarkan nilai ΔG serta kesamaan residu asam amino, senyawa procyanidin menunjukkan afinitas tertinggi terhadap protein thrombin. Visualisasi interaksi dan penjelasan lebih lanjut mengenai keterikatan dari senyawa aktif daun sirsak terhadap thrombin bisa diamati pada **Gambar 3, Gambar 4, dan Tabel 3.**



Gambar 3: Visualisasi 2D Oxazolopyridine inhibitor 21

Keterangan: Visualisasi interaksi oxazolopyridine inhibitor 21 dengan thrombin. Thrombin berikatan pada binding site Glu192, His57, Gly216, Gly219, Glu217, Glu217, Ile174, Leu99, Trp215, Ser214, Ala190, Cys 191.



Gambar 4: Visualisasi 2D procyanidin

Keterangan: Gambar visualisasi interaksi senyawa procyanidin terhadap Protein thrombin. procyanidin berikatan pada binding site Gly219, Glu217, Trp215, Ser214, dan Gly21

Tabel 3 Penambatan Molekul Senyawa Fitokimia Terhadap Protein Thrombin

Senyawa aktif (Ligan)	Nilai energi ikatan bebas (kkal/mol) ΔG	Residu asam amino	Persentase kemiripan residu asam amino (%)
Oxazolopyridine inhibitor 21 (Native ligan)	-10.1	Hydrogen bond: HIS57, GLY216, GLY219 Hydrophobic: ILE174, LEU99, ALA190 Van der Waals: GLU192, GLU217 Non kovalen: TRP215, SER214, CYS191	11/11 (100%)
Procyanidin	-9.5	Hydrogen bond: ASP189, SER195, GLY219 Van der Waals: GLU217 Hydrophobic: ALA190, VAL123, TRP215, SER214, GLY216, CYS220 Cation & anion: HIS57, GLU192	5/11 (45%)
Myrica acid	-8.6	Hydrogen bond: GLY216 Hydrophobic: HIS57, TRP60D, LEU99, ILE174	2/11 (18%)
Muricinine	-7.5	Hydrogen bond: HIS57, SER214, TRP215, GLY216 Hydrophobic: TRP60D, ALA190, VAL123, TYR228	4/11 (36%)
Reticuline	-7.4	Hydrogen bond: GLU192, GLY216, GLY219, GLY226, SER214 Hydrophobic: TRP215, CYS191, VAL123, TYR228, ALA190 Sulfur: CYS220	5/11 (45%)
Coclaurine	-7.3	Hydrogen bond: SER195, GLU192, GLY216 Hydrophobic: TRP60D, CYS220, ALA190, CYS195, TRP215, LEU99 Cation: HIS57	4/11 (36%)

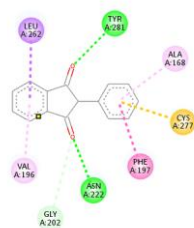
Senyawa aktif (Ligan)	Nilai energi ikatan bebas (kkal/mol) ΔG	Residu asam amino	Persentase kemiripan residu asam amino (%)
Galactomannan	-7.3	Hydrogen bond: ASP189, ALA190, GLY216 ARG221, GLU146, CYS191, SER214, SER195	4/11 (36%)
Coreximine	-7.0	Hydrogen bond: SER214 , TYR60A Hydrophobic: TRP60D, LEU99, ILE174	2/11 (18%)
Anomuricine	-6.9	Hydrogen bond: TYR60A, GLY219 Hydrophobic: LEU99, TRP60D, HIS57	2/11 (18%)
Anomurine	-6.9	Hydrogen bond: HIS57 , TYR60A, GLY219 Hydrophobic: TRP60D, TRP215, ILE174	3/11 (27%)
Geranyl hexanoate	-6.6	Hydrogen bond: TRP215 Hydrophobic: ALA190 , LEU99, HIS57, TRP60D, ILE174	3/11 (27%)
Caffeic Acid	-6.3	Hydrogen bond: TRP215 , PHE227, GLY226 Hydrophobic: CYS220 Hydrogen bond: TRP215 , PHE227, GLY226	1/11 1/11 (9%)
Stearic Acid	-6.0	Hydrogen bond: PHE227, GLY226 Hydrophobic: LEU99, ALA190, HIS57, TRP60D	2/11 (18%)
Pantothenic Acid	-6.0	Hydrogen bond: GLY123, GLY216, ALA190 GLY219 , GLY226 Hydrophobic: TRP60D	3/11 (27%)
P-coumaric acid	-5.9	Hydrogen bond: PHE227, TRP215, GLY216, GLU192, GLY226 Hydrophobic: CYS191, CYS220	4/11 (36%)
Isocitric acid	-5.9	Hydrogen bond: PHE227, ALA190, TRP215 GLY216, SER195	3/11 (27%)
Ascorbic Acid	-5.7	Hydrogen bond: CYS191, GLY291, GLY216, TRP215	4/11 (36%)
Citrulline	-5.4	Hydrogen bond: ASP189, GLY219, HIS57, SER195	2/11 (18%)
Lignoceric Acid	-5.1	Hydrogen bond: GLY219, CYS191 Hydrophobic: TRP60D, ILE174 , LEU99, HIS57	3/11 (27%)
Amyl hexanoate	-5.0	Hydrogen bond: TYR60A Hydrophobic: ILE174, TRP215, TRP60D	2/11 (18%)
Maleic Acid	-4.8	Hydrogen bond: PHE227, TRP215, SER195, CYS191	2/11 (18%)
Gaba	-4.5	Hydrogen bond: TRP215, ALA190, ASP189	1/11 (9%)
Methyl hexanoate	-4.3	Hydrogen bond: TYR60A Hydrophobic: LEU99, ILE174	1/11 (9%)

Keterangan: Hasil docking senyawa aktif dari daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap protein thrombin menunjukkan bahwa penelitian ini menggunakan pendekatan ligan asli (native ligand) sebagai kontrol obat. Oleh karena itu, residu asam amino yang dicetak tebal sebagai situs pengikatan (binding site) pada protein target 1ZGI sesuai dengan residu asam amino dari ligan asli, yaitu oxazolopyridine inhibitor 21.* Persamaan residu asam amino ini tidak melihat jenis ikatan sehingga jika berbeda jenis ikatannya tetap dianggap sama asalkan memiliki binding site yang mirip dengan control *

Penambatan Molekul Senyawa Aktif Daun Sirsak dan Phenindione terhadap Protein Human VKOR

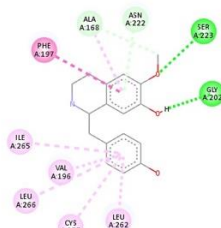
Nilai energi ikatan bebas (ΔG) ligan phenindione pada protein human VKOR (Vitamin K epoxide reductase) tercatat sebesar -9,9 kkal/mol, dengan interaksi terhadap delapan residu asam amino. Dari total 22 senyawa aktif pada daun sirsak (*Annona muricata*) yang diuji melalui proses docking, terdapat enam senyawa yang menunjukkan bahwa nilai energi ikatan bebas di bawah -7 kkal/mol. Keenam senyawa aktif yang dimaksud adalah procyanidin, muricinine, reticuline, coclaurine, anomuricine,

dan geranyl hexanoate. Kemiripan residu asam amino dibandingkan dengan kontrol yaitu procyanidin 62%, muricinine 75 %, reticuline 50%, coclaurine 87%, anomuricine 50%, geranyl hexanoate 50 %. Berdasarkan nilai (ΔG) dan kemiripan residu asam amino terkait senyawa aktif yang memiliki afinitas dengan nilai tertinggi terhadap protein *human* VKOR adalah coclaurine. Penjelasan ini disajikan pada gambar 5 dan 6, **tabel 4**.



Gambar 5: Visualisasi 2D Phenindione

Keterangan: Gambar interaksi Phenindione terhadap human VKOR. Phenindione yang berikatan dengan binding site Asn222, Tyr281, Gly202, Val196, Ala168, Leu262, Phe197, Cys277.



Gambar 6: Visualisasi 2D Coclaurine

Keterangan: Gambar interaksi muricinine terhadap AT1R. muricinine yang berikatan pada binding site Ala168, Asn222, Ser223, Gly202, Phe197, Ile265, Leu266, Cys277, Leu262.

Hasil Prediksi Sifat Fisikokimia Senyawa Aktif Daun Sirsak (*Annona muricata*) dengan PKCSM

Penilaian prediksi karakteristik fisikokimia yang telah dilakukan terhadap 22 senyawa aktif yang berasal dari daun sirsak. Dari hasil tersebut, diketahui bahwa dua senyawa, yaitu procyanidin dan galactomannan, tidak sesuai dengan kaidah Lipinski's Rule of Five, sementara 20 senyawa lainnya memenuhi kelima parameter yang ditetapkan. Hasil lengkap prediksi ini disajikan pada Tabel 4. Senyawa dinyatakan mengacu pada aturan Lipinski's Rule of Five apabila mempunyai berat molekulnya kurang dari 500 Dalton, nilai log P di bawah 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen (HBA) kurang dari 10, serta donor ikatan hidrogen (HBD) kurang dari 5.

Dari berbagai bahan aktif daun sirsak diketahui dapat menunjukkan keterikatan (afinitas) terhadap protein thrombin dan Human VKOR (*Vitamin K epoxide reductases*) didapatkan bahwa senyawa coclaurine, muricine, anomuricine, geranyl hexanoate dan reticuline memenuhi kriteria Lipinski. Hal ini dapat diprediksi bahwa lima senyawa tersebut memiliki nilai kelarutan yang baik dalam darah.

Tabel 4 Penambatan Molekul Senyawa Fitokimia Terhadap Protein Human VKOR

Senyawa aktif (Ligan)	Nilai energi ikatan bebas (kcal/mol) ΔG	Residu asam amino	Persentase persamaan residu asam amino (%)
Phenindione (Native ligand)	-9.9	Hydrogen bond : ASN222, TYR281, GLY202 Hydrophobic : VAL196, ALA168 Interaksi pi-sigma : LEU262 Interaksi Pi T-shaped : PHE197 Interaksi Pi-sulfur : CYS277	8/8 (100%)
Muricinine	-9.3	Hydrogen bond : SER223, GLY202, ALA168, ASN222 Hydrophobic : CYS277, PHE197, LYS172, TRP201, VAL196, ILE265, LEU270	6/8 (75%)
Coclaurine	-8.9	Hydrogen bond : ALA168, ASN222, SER223, GLY202 Hydrophobic : PHE197, ILE265, VAL196, LEU266, CYS277, LEU262	7/8 (87%)
Reticuline	-7.9	Hydrogen bond : SER199, VAL196, TYR281, LEU262 Interaksi Pi-sigma: THR280 Hydrophobic : TRP201, ILE265, CYS277, PHE205	4/8 (50%)
Procyanidin	-7.9	Hydrogen bond : ASN222, CYS277, SER223 Hydrophobic : LYS172, LEU270, ILE265 Unfavorable donor: SER165, ALA168, THR280, LEU262, VAL196, SER199	5/8 (62%)
Anomuricine	-7.5	Hydrogen bond : SER165, SER223, ASN222, SER199 Interaksi pi-sigma: LEU262 Hydrophobic: CYS277, VAL196, LEU270, ILE265, TRP201, PHE205	4/8 (50%)

Senyawa aktif (Ligan)	Nilai energi ikatan bebas (kkal/mol) ΔG	Residu asam amino	Persentase persamaan residu asam amino (%)
Geranyl hexanoate	-7.2	Hydrogen bond: SER165 Hydrophobic: CYS277,PHE197,PHE205, LEU262,ALA168,ILE265,VAL196	4/8 (50%)
Caffeic acid	-7.1	Hydrogen bond: PHE197,GLY202, SER223,LEU262,ASN222 Hydrophobic: CYS277,VAL196	5/8 (50%)
P-coumaric acid	-6.9	Hydrogen bond: GLY202,SER223, LEU262,TYR281,ASN222 Hydrophobic : VAL 196, CYS277	6/8 (75%)
Stearic acid	-6.8	Hydrogen bond : PHE197,SER223 Hydrophobic: LEU262,VAL276,ILE265, VAL196,CYS277,ALA168	5/8 (62%)
Coreximine	-6.5	Hydrogen bond: SER199, VAL196, LEU262,SER165,THR280 Hydrophobic : TRP201,ILE265, ALA168,LEU164 Unfavorable bump : LEU270	3/8 (37%)
Lignoceric acid	-6.5	Hydrogen bond : GLY226 Hydrophobic : CYS 277,LEU262,TYR281, ALA168,ILE265,LEU266,VAL196,PHE197,LYS172	6/8 (75%)
Citrulline	-5.9	Hydrogen bond : SER223,SER165, LEU164,THR280,LYS172	0/8 (0%)
Amyl hexanoate	-5.9	Hydrogen bond: ASN 222,VAL196 Hydrophobic : LYS172, PHE197,ALA168, ILE265,LEU262,LEU266	5/8 (62%)
Panthotenic acid	-5.9	Hydrogen bond : PHE197,TYR281,ASN222	3/8 (37%)
Anomurine	-5.7	Hydrogen bond: SER223, ASN222,SER165, ALA168,VAL276,VAL196,SER199 Interaksi PI-Sigma: LEU262 Interaksi PI-T Shaped: PHE197 Hydrophobic : CYS277,LEU266, LEU270,ILE265,TRP201	6/8 (75%)
Ascorbic acid	-5.7	Hydrogen bond : ASN222,SER165	1/8 (12%)
Isocitric acid	-5.4	Hydrogen bond : GLY202,ASN222,SER223	2/8 (25%)
Myarica acid	-5.2	Hydrogen bond : GLY161,CYS277 Unfavorable donor : ASN222,TRP201,PHE197, SER165,THR280,LEU262,LEU266	4/8 (50%)
Maleic acid	-5.1	Hydrogen bond : ASN 222,GLY202,SER199 Unfavorable acceptor: VAL196	3/8 (37%)
GABA	-4.8	Hydrogen bond : TYR281,ASN222,GLY202	3/8 (37%)
Methyl hexanoate	-4.7	Hydrogen bond : ASN 222 Hydrophobic : LEU266,LEU262,ILE265,VAL196	3/8 (37%)
Galactomann an	-4.0	Hydrogen bond : LEU262,PHE197, ASN222,SER165,LEU164 Unfavorable donor : VAL 196	4/8 (50%)

Keterangan: Data dari hasil docking kandungan senyawa aktif dalam daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap protein human VKOR menunjukkan bahwa penelitian ini menggunakan ligan asli (native ligand) sebagai kontrol obat. Oleh karena itu, residu asam amino yang dicetak tebal sebagai situs pengikatan (binding site) pada protein target 6WV6 memiliki kesamaan dengan residu asam amino pada native ligan, yaitu Phenindione* Persamaan residu asam amino ini tidak melihat jenis ikatan sehingga jika berbeda jenis ikatannya tetap dianggap sama asalkan memiliki binding site yang mirip dengan control *

Tabel 5 Sifat Fisikokimia Senyawa Fitokimia Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Nama Senyawa Aktif	CID	Rumus Kimia	Berat Molekul (g/mol)	Log P	HBA	HBD	Lipinski Rules
GABA	ABA	C ₄ H ₉ NO ₂	103.121	-0.1901	2	2	Terpenuhi
Isocitric acid	1198	C ₆ H ₈ O ₇	192.123	-1.3926	4	4	Terpenuhi
Pantothenic Acid	6613	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.237	-1.0433	4	4	Terpenuhi
Citrulline	9750	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.188	-1.1532	3	4	Terpenuhi
Amyl hexanoate	10886	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.295	3.3001	2	0	Terpenuhi
Procyanidin	107876	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	594.525	2.7327	13	10	Tidak terpenuhi
Anomuricine	157209	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	329.396	2.8475	5	2	Terpenuhi
Anomurine	157218	C ₂₀ H ₂₅ NO ₄	343.423	3.1505	5	1	Terpenuhi
Coclaurine	160487	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.343	2.5359	4	3	Terpenuhi
Galactomannan	439336	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.438	-7.573	16	11	Tidak terpenuhi
Reticuline	439653	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	329.396	2.8867	5	2	Terpenuhi
Maleic Acid	444266	C ₄ H ₄ O ₄	116.072	-0.2882	2	2	Terpenuhi
P-coumaric acid	637542	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	1.49	2	2	Terpenuhi
Caffeic Acid	689043	C ₉ H ₈ O ₄	180.159	1.1956	3	3	Terpenuhi
Coreximine	7037179	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.38	2.7705	5	2	Terpenuhi
Ascorbic Acid	54670067	C ₆ H ₈ O ₆	176.124	-1.4074	6	4	Terpenuhi
Muricinine	131750994	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.353	2.5249	5	3	Terpenuhi
Geranyl hexanoate	5365992	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	252.398	4.8026	2	0	Terpenuhi
Methyl hexanoate	7824	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.187	1.7397	2	0	Terpenuhi
Myrica acid	10576259	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.678	6.3327	3	2	Terpenuhi
Stearic Acid	5381	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.484	6.3325	1	1	Terpenuhi
Lignoceric Acid	11197	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.646	8.6731	1	1	Terpenuhi

Keterangan: Hasil data prediksi parameter fisikokimia senyawa aktif yang menunjukkan afinitas penambatan terbaik terhadap protein thrombin dan enzim VKOR pada manusia

Prediksi Farmakokinetik Senyawa Aktif Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Berdasarkan hasil dari penilaian prediksi ADMET yang telah dilakukan pada senyawa aktif yang memiliki afinitas baik terhadap protein thrombin dan *human* VKOR (*Vitamin K epoxide reductases*) dapat dilihat pada **tabel 6**. Senyawa terbaik yaitu procyanidin, muricinine, reticuline, coclaurine, galactomannan,

anomuricine, geranyl hexanoate menggunakan website pkCSM. Berdasarkan nilai absorpsi didapatkan Geranyl hexanoate memiliki nilai absorpsi 93.83%, Coclaurine 92.87%, reticuline 91.13%, anomuricine, 90.87 % muricinine 69.40, procyanidin, 55.52, galactomannan 0 %. Zat aktif dikatakan memiliki angka absorpsi yang baik jika >80%.

Berdasarkan indikator volume distribusi senyawa (vdss), yang menunjukkan sejauh mana senyawa terdistribusi dalam tubuh, diketahui bahwa coclaurine memiliki nilai vdss sebesar 1,17 Log L/Kg, diikuti oleh anomuricine sebesar 0,996 Log L/Kg, reticuline 0,778 Log L/Kg, geranyl hexanoate 0,271 Log L/Kg, procyanidin 0,193 Log L/Kg, muricine -0,198 Log L/Kg, dan galactomannan -0,264 Log L/Kg. Senyawa dikategorikan memiliki distribusi yang baik apabila nilai vdss-nya lebih dari 0,45 Log L/Kg.

Berdasarkan indikator distribusi, zat aktif daun sirsak dimana memiliki kemampuan untuk menembus Blood Brain Barrier (BBB) antara lain procyanidin (-1.783 log BB), galactomannan (-1.785 log BB), anomuricine (-0.332 log BB), reticuline (-0.502 log BB), muricine (-0.647 log BB), coclaurine (0.177 log BB), dan geranyl hexanoate (0.648 log BB). Senyawa procyanidin (-1.783 log BB) dan galactomannan (-1.785 log BB) tidak dapat menembus BBB karena memiliki nilai BBB yang lebih rendah dari -1.

Berdasarkan indikator metabolisme senyawa aktif yang tidak memiliki pengaruh terhadap metabolisme CYP adalah procyanidin, muricinine, geranyl hexanoate dan galactomannan sehingga senyawa ini tidak mengganggu proses metabolisme senyawa aktif di hepar. Adapaun Reticuline, anomuricine dan coclaurine mempengaruhi metabolisme CYP 3A4.

Berdasarkan indikator ekskresi didapatkan senyawa procyanidin dan muricinine mempunyai nilai klirens yang buruk semakin tinggi nilai klirens semakin rendah resiko terjadinya penumpukan senyawa aktif dalam darah. Nilai ekskresi yang baik yaitu kurang dari -1 atau mendekati -1. Ekskresi senyawa dinilai berdasarkan parameter CL_{tot} (klirens total) yang diukur dalam unit Log ml/menit/kg. Nilai CL_{tot} yang tinggi mengindikasikan bahwa senyawa tersebut diekskresikan dengan lebih cepat dari dalam tubuh. Klirens total merupakan akumulasi dari klirens hati dan klirens ginjal⁽¹⁴⁾.

Berdasarkan penilaian toksisitas yaitu hepatotoksik dan ames didapatkan bahwa senyawa coclaurine, reticuline, dan anomuricine bersifat hepatotoksik akan tetapi tidak bersifat ames. Hepatotoksitas adalah kondisi kerusakan hati yang timbul akibat paparan senyawa berbahaya yang menimbulkan reaksi merugikan pada organ tersebut⁽⁴¹⁾. Uji Ames adalah metode untuk menguji toksisitas dengan menggunakan bakteri, yang bertujuan untuk menilai potensi dari suatu senyawa dapat bersifat mutagenik atau tidak. Jika temuan dari hasil uji menunjukkan positif, berarti suatu senyawa tersebut berpotensi bersifat mutagenik serta dapat bertransformasi menjadi karsinogen yang dapat menyebabkan penyakit kanker.⁽³⁹⁾

Tabel 6 Prediksi ADMET Senyawa Fitokimia Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Nama Senyawa	Absorbtion	Distribusi		Metabolisme				Eksresi	Toksistas	
	Absorbsi pada usus (%)	Vdss (Log L/Kg)	BBB (log BB)	CYP 2D6 substrat	CYP 3A4 substrat	CYP 2D6 inhibitor	CYP 3A4 inhibitor	Total Clearance (ml/min /kg)	Hepatot oksik	AMES
GABA	77.806	-0.712	-1.022	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.892	Tidak	Tidak
Isocitric acid	0	-0.712	-1.022	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.892	Tidak	Tidak
Pantothenic Acid	30.442	-1.15	-0.8	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.595	Tidak	Tidak
Citrulline	39.008	-0.491	-0.786	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.282	Tidak	Tidak
Amyl hexanoate	93.914	0.134	0.623	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	1.661	Tidak	Tidak
Procyanidin	55.527	0.193	-1.783	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	-0.058	Tidak	Tidak
Anomuricine	90.876	0.996	-0.332	Iya	Iya	Iya	Tidak	1.003	Iya	Tidak
Anomurine	92.132	1.062	-0.265	Tidak	Iya	Iya	Tidak	1,00	Iya	Tidak
Coclaurine	92.875	1.17	0.177	Iya	Iya	Iya	Tidak	1.075	Iya	Tidak
Galactomannan	0	-0.264	-1.785	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	1.601	Tidak	Tidak

Reticuline	91.276	0.778	-0.502	Iya	Iya	Tidak	Tidak	1.003	Iya	Tidak
Maleic Acid	71.771	-1.026	-0.127	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.89	Tidak	Tidak
P-coumaric acid	93.494	-1.151	-0.225	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.662	Tidak	Tidak
Caffeic Acid	69.407	-1.098	-0.647	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.508	Tidak	Tidak
Coreximine	92.388	1.368	0.127	Iya	Iya	Iya	Tidak	1.111	Tidak	Iya
Ascorbic Acid	39.154	0.218	-0.985	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.631	Tidak	Tidak
Muricinine	69.407	-1.098	-0.647	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.508	Tidak	Tidak
Geranyl hexanoate	93.834	0.271	0.648	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	1.755	Tidak	Tidak
Methyl hexanoate	95.791	-0.053	0.429	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	0.517	Tidak	Tidak
Myrica acid	99.251	-0.975	0.088	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	-0.115	Iya	Tidak
Stearic Acid	91.317	-0.528	-0.195	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	1.832	Tidak	Tidak
Lignoceric Acid	89.255	-0.59	-0.448	Tidak	Iya	Tidak	Tidak	2.034	Iya	Tidak

Keterangan: Tabel hasil prediksi ADMET untuk senyawa aktif daun sirsak yang dapat berpotensi mengaktifkan protein thrombin dan menghambat human VKOR diperoleh melalui situs pkCSML.

PEMBAHASAN

Prediksi Afinitas Senyawa Daun Sirsak Terhadap Protein Thrombin Dan Human VKOR

Indikator afinitas suatu senyawa aktif terhadap protein pada penelitian ini menggunakan besarnya nilai energi ikatan bebas dan kemiripan residu asam amino. Energi ikatan bebas (ΔG) merupakan bentuk dari hasil ikatan antara protein target atau reseptor terhadap ligan dan interaksi antara ligan dengan protein. Hasil dari suatu ikatan antara ligan dan protein control (target) akan membentuk sebuah konformasi ligan berdasarkan nilai ΔG . Apabila nilai ΔG yang dihasilkan semakin kecil maka hal ini menunjukkan semakin stabil ligan yang berikatan dengan protein reseptor (target). ΔG adalah energi yang memiliki peran penting bagi ligan untuk dapat berikatan atau berinteraksi dengan baik pada *binding site* dari protein target⁽²³⁾⁽³³⁾. Apabila pada senyawa aktif terdapat sejumlah besar kesamaan residu asam amino yang berikatan dengan native ligand maka kemungkinan senyawa tersebut memiliki kemampuan yang kuat untuk menghambat atau mengaktifkan aktivitas suatu reseptor target⁽³³⁾.

Hasil penambatan molekuler senyawa aktif dari daun sirsak terhadap protein thrombin menunjukkan bahwa lima senyawa aktif diperkirakan memiliki afinitas terhadap protein thrombin dan *human VKOR*. Kelima senyawa tersebut adalah procyanidin, muricinine, reticuline, coclaurine, dan galactomannan.

Procyanidin adalah senyawa aktif golongan fenol yang memiliki efek farmakologis sebagai antioksidan sehingga dapat menangkal radikal bebas serta mengurangi produk peroksidasi lipid. Pada saat terjadi stroke iskemik akibat sumbatan

aliran darah otak akan menyebabkan defisit suplai oksigen pada daerah yang terdampak. Hal tersebut menyebabkan terjadinya stress oksidatif yang berperan dalam inisiasi dan terjadinya apoptosis serta inflamasi pada sel neuron. Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa senyawa aktif dari tanaman terutama senyawa fenol berpotensi melindungi sel neuron terhadap proses stroke iskemik. Melalui mekanisme sebagai *scavenger* radikal bebas dan meningkatkan produksi enzim⁽²⁶⁾.

Procyanidin diprediksi mampu menghambat kedua protein target namun afinitasnya lebih tinggi pada *human VKOR*. Ikatan antara procyanidin dengan *human VKOR* akan menghambat aktivasi vitamin K. hal ini menyebabkan proses aktivasi pembentukan thrombin akan berkurang sehingga menurunkan pembentukan thrombus. Dengan demikian aliran darah otak dapat kembali normal.

Muricinine adalah senyawa aktif golongan terpenoid hasil penelitian sebelumnya disebutkan bahwa muricinine mampu mencegah terjadinya stroke iskemik melalui mekanisme penurunan kadar kolesterol darah. Berdasarkan pernyataan dari Yang *et al.*, (2022) muricinine memiliki target utama dalam penurunan kolesterol yaitu terhadap ADRB2 dan ADRB3 protein pada hiperlipidemia. Penyakit hiperlipidemia merupakan salah satu faktor intrinsik yang dapat memicu terbentuknya trombus berlebih yang dapat mengakibatkan sumbatan pada pembuluh darah⁽²¹⁾.

Reticuline merupakan senyawa aktif dari kelompok alkaloid yang diketahui memiliki berbagai efek farmakologis, seperti anti bakteri, anti inflamasi, anti fungi dan juga memiliki efek sebagai anti koagulan⁽²⁶⁾. Senyawa reticuline ini dapat bekerja sebagai antikoagulan melalui penghambatan jalur koagulasi baik secara

ekstrinsik dan intrinsik⁽²⁶⁾. Proses ini dilakukan melalui penghambatan produksi FXa (factor x a), thrombin dan menghambat TNF- α . Dari hasil docking dapat diprediksi bahwa reticuline mempunyai afinitas terhadap protein thrombin dan *human* VKOR namun potensinya lebih besar terhadap protein *human* VKOR. Reticuline diprediksi dapat menyebabkan inaktivasi pembentukan vitamin K sehingga menurunkan pembentukan thrombus.

Galactomannan adalah senyawa aktif golongan polisakarida. Galactomannan diketahui memiliki aktivitas sebagai agen antidiabetes serta mampu berpotensi menurunkan kadar kolesterol dalam sirkulasi darah.⁽²⁷⁾ Berdasarkan penelitian secara biologis menggunakan hewan coba kelinci senyawa galactomannan termasuk dalam kelompok senyawa polisakarida, mampu mengurangi kadar kolesterol dalam darah lebih baik daripada obat simvastatin. Dimana ini bisa menjadi salah satu faktor instrinsik yang dapat mengurangi perburukan sumbatan yang terbentuk pada pembuluh darah⁽²⁸⁾. Hasil docking menunjukkan bahwa galactomannan mempunyai afinitas terhadap protein thrombin ikatan tersebut menyebabkan penurunan pembentukan thrombin yang berdampak pada penurunan pembentukan thrombus.

Coclaurine merupakan senyawa aktif golongan heterocyclic. Coclaurine disebutkan mempunyai potensi menurunkan kadar koleterol darah. Berdasarkan hasil docking coclaurine diprediksi menghambat protein thrombin dan *human* vkor namun potensinya lebih besar pada protein *human* VKOR. Dengan demikian coclaurine dapat mencegah terjadinya pembentukan thrombus melalui mekanisme penghambatan aktivasi vitamin K⁽²¹⁾.

Penambatan Molekul Senyawa Aktif *Annona muricata* dengan *human* VKOR

Berdasarkan hasil evaluasi docking terhadap 22 senyawa aktif yang terdapat dalam daun sirsak pada protein *human* VKOR (Vitamin K epoxide reductase) hal ini bisa diamati pada **tabel 4** menampilkan hasil penambatan antara kontrol phenindione dan protein enzim *human* VKOR menunjukkan besaran nilai energi ikatan bebas (ΔG) sebanyak -9,9 kkal/mol, dengan persentase total residu asam amino yang terlibat adalah 8 buah antara lain ikatan hydrogen TYR281, ASN222, GLY202, ikatan hidrofobik VAL196, ALA168, interaksi pi-sigma-LEU262, interaksi pi-T shaped PHE197, interaksi pi-sulfur CYS277. Kemudian, hasil docking antara senyawa dan ligan dibandingkan. Berdasarkan evaluasi dari nilai energi ikatan bebas (ΔG) serta persentase residu asam amino yang berikatan, diperoleh hasil bahwa zat aktif dari daun sirsak menunjukkan afinitas pada protein *human* VKOR adalah muricinine, coclaurine, reticuline, procyanidin, anomuricine, dan geranyl hexanoate⁽²⁹⁾. Senyawa aktif yang tidak ada pada

protein thrombin adalah anomuricine dan geranyl hexanoate. Dari 7 senyawa aktif daun sirsak dapat diketahui bahwa reticuline dan coclaurine memiliki afinitas terhadap protein thrombin dan juga protein *human* VKOR.

Prediksi Fisikokimia Senyawa aktif Daun Sirsak

Mengacu pada data hasil pengujian analisis fisikokimia menunjukkan bahwa uji ini penting untuk mengevaluasi kemampuan senyawa dalam hal absorpsi dan permeabilitas. Kriteria yang digunakan berdasarkan aturan Lipinski mencakup beberapa parameter, yaitu dilihat dari banyaknya donor ikatan hidrogen (H-Bond Donors/HBD) tidak melebihi lima, jumlah akseptor ikatan hidrogen (H-Bond Acceptors/HBA) tidak melebihi dari sepuluh, berat molekul maksimal 500 dalton (g/mol), serta nilai Log P (Clog P) tidak lebih dari lima.⁽³⁵⁾

Dari lima zat aktif daun sirsak (*Annona muricata*) yang menunjukkan afinitas terhadap protein thrombin dan *human* VKOR, reticuline, muricinine, dan coclaurine merupakan senyawa yang memiliki kelarutan yang baik. Berdasarkan indikator seperti berat molekul, log P, jumlah akseptor dan donor ikatan hidrogen (HBA dan HBD), ketiga senyawa tersebut diperkirakan mempunyai tingkat permeabilitas yang tinggi terhadap saluran pencernaan dan membran lipid bilayer, sehingga memungkinkan distribusi yang efisien dalam tubuh. Sementara itu, procyanidin dan galactomannan tidak memenuhi kriteria aturan Lipinski, sehingga diperkirakan memiliki kelarutan yang rendah di dalam darah.

Prediksi ADMET Senyawa aktif Daun Sirsak

Penilaian dari prediksi farmakokinetik ini dilakukan untuk mengevaluasi Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET). Dari kelima senyawa yang menunjukkan afinitas terhadap kedua protein target, diperoleh bahwa coclaurine memiliki nilai absorpsi >80% di usus. Absorpsi yang baik berperan penting dalam meningkatkan konsentrasi suatu enyawa aktif di plasma pada protein target. Penilaian absorpsi yang baik pada usus ditandai dengan nilai presentase >80%. Nilai absorpsi yang optimal memiliki peran krusial dalam meningkatkan konsentrasi senyawa aktif pada plasma dan protein target.

Berdasarkan indikator distribusi yang dinilai dari kemampuan menembus BBB dan VDSS didapatkan bahwa senyawa coclaurine mempunyai nilai BBB <-1 dan nilai VDSS 1,17 Log L/kg. Nilai BBB dikatakan tidak menembus jika BBB <-1 dan VDSS (*Volume of Distribution at Steady State*) yang baik jika nilai ≥ -0.15 . berdasarkan hal ini mengindikasikan bahwa coclaurine mampu terdistribusi secara bebas dalam aliran darah, namun tidak mampu melampaui barrier sawar darah-otak (Blood Brain Barrier/BBB).serta terdistribusikan dengan baik dalam plasma darah secara merata. Ketidak

mampuan suatu senyawa menembus BBB menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak mempengaruhi sel neuron.

Berdasarkan indikator metabolisme, senyawa reticuline, anomuricine, dan coclaurine diketahui mampu berikatan dengan enzim metabolik CYP3A4. Enzim sitokrom P450 (CYP450), yang banyak ditemukan di hati, berfungsi sebagai enzim detoksifikasi utama dalam tubuh. Secara umum, enzim ini berperan penting dalam proses metabolisme obat dengan cara mengoksidasi xenobiotik, yaitu senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh, agar dapat dikeluarkan melalui mekanisme ekskresi. Dua isoform utama dari enzim ini, yaitu CYP2D6 dan CYP3A4, memiliki peran signifikan dalam memengaruhi laju metabolisme obat.⁽³⁸⁾ CYP3A4, secara khusus, dapat menurunkan bioavailabilitas dan efektivitas terapeutik obat dengan mempercepat proses degradasi obat. Sebaliknya, jika enzim ini terhambat, konsentrasi kadar obat dalam plasma bisa meningkat. Selain perannya dalam proses detoksifikasi serta pengeluaran xenobiotik, CYP3A4 juga dapat menyebabkan efek genotoksik dengan mengaktifkan prokarsinogen, serta berperan dalam terjadinya interaksi antarobat.⁽⁴⁰⁾

Berdasarkan indikator ekskresi reticuline, coclaurine, dan galactomannan, memiliki nilai klirens yang baik sedangkan procyanidin dan muricinine memiliki nilai ekskresi yang buruk. Ekskresi senyawa dapat dievaluasi melalui parameter CL_{tot} (klirens total) yang dinyatakan dalam satuan unit Log ml/menit/kg. Nilai CL_{tot} yang tinggi menunjukkan bahwa senyawa dikeluarkan dari tubuh dengan lebih cepat. Klirens total ini merupakan kombinasi dari klirens yang terjadi di hati dan ginjal⁽¹⁴⁾.

Berdasarkan indikator toksisitas, reticuline, dan coclaurine memiliki efek hepatotoksik akan tetapi tidak memiliki efek AMES sedangkan procyanidin, muricinine, dan galactomannan Tidak menunjukkan efek hepatotoksik maupun hasil positif pada uji Ames. Hepatotoksitas adalah kondisi kerusakan pada hati yang dapat disebabkan oleh paparan senyawa yang menimbulkan reaksi merugikan. Sedangkan uji Ames adalah metode pengujian toksisitas yang menggunakan media bakteri untuk mengevaluasi kemampuan mutagenik suatu senyawa. Jika hasil dari uji Ames menunjukkan hasil positif, berarti senyawa tersebut memiliki potensi untuk bersifat mutagenik dan dapat berkembang menjadi karsinogen yang dapat menyebabkan kanker⁽³⁹⁾.

SIMPULAN

Senyawa aktif reticuline dan coclaurine, diprediksi memiliki afinitas terhadap protein thrombin dan protein Human VKOR, namun afinitasnya lebih baik pada protein Human

VKOR. Kedua senyawa tersebut cenderung bersifat hepatotoksik.

Penelitian secara *in silico* harus dibuktikan secara laboratoris, sehingga peneliti menyarankan untuk dilakukan studi lebih lanjut menggunakan hewan coba untuk mengetahui potensi sebagai trombolitik, serta perlu dilakukan uji toksisitas kronis untuk mengetahui efek daun sirsak terhadap kerusakan hepar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan ini penulis menyampaikan apresiasi kepada para peninjau tulisan ini, Asosiasi Orang Tua Dari Para Mahasiswa (IOM), Dekan Fakultas Kedokteran UNISMA yang sudah menyediakan dukungan biaya, serta seluruh anggota tim riset yang telah berkontribusi dalam riset ini, kami mengucapkan terima kasih.

REFERENSI

1. Albright, R. A., Ornstein, D. L., Cao, W., Chang, W. C., Robert, D., Tehan, M., Hoyer, D., Liu, L., Stabach, P., Yang, G., De La Cruz, E. M., & Braddock, D. T. (2014). dasar molekuler metabolisme sinyal purinergik oleh nukleotida pirofosfatase/fosfodiesterase 4 dan 1 serta implikasinya pada stroke. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), 3294–3306.
2. Anggraini, R., F, Y. V., & Masruhim, M. A. (2016). Asuhan Keperawatan Pada Sistem Kardiovaskuler Dewasa. Yogyakarta: Graha Ilmu. *Terapi Penggunaan Obat Stroke Pada Pasien Stroke Iskemik di RSUD Abdul wahab sjahrane Samarinda, April 2016*, 20–21.
3. Arifianto. (2014). Klasifikasi Stroke Berdasarkan Kelainan Patologis dengan Learning Vector Quantiation. *Eccis*, 8(2), 117–122.
4. Ayu, A., & Putri, N. (2023). Gambaran epidemiologi stroke di Jawa timur tahun 2019-2021 Andina Ayu Natasya Putri. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 7(1), 1030–1036.
5. Cahyawati, P. N. (2020). Efek farmakologi dan toksik sirsak (*Annona muricata*): A minireview. *Biomedika*, 12(2), 107–116.
6. Chaudhary, S., Godatwar, P., & Sharma, R. (2015). *In vitro* thrombolytic activity of *Dhamasa* (*Fagonia arabica* Linn.), *Kushta* (*Saussurea lappa* Decne.), and *Guduchi* (*Tinospora cordifolia* Thunb.)
7. Chugh, C. (2019). Acute ischemic stroke: Management approach. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 23, S140–S146. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23192>
8. Hasnila, I. (2019). Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Fortifikasi

- Nanokitosan sebagai Antibakteri dan Antioksidan*. 11–12.
9. Yuniarti, L., Dewi, M. K., Lantika, U. A., & Bhatara, T. (2016). Potensi Ekstrak Air Daun Sirsak sebagai Penurun Kolesterol dan Pengendali Bobot Badan. *ActaveterinariaIndonesiana*, 4(2), 82–87. <https://doi.org/10.29244/avi.4.2.82-87>
 10. Albright, R. A., Ornstein, D. L., Cao, W., Chang, W. C., Robert, D., Tehan, M., Hoyer, D., Liu, L., Stabach, P., Yang, G., De La Cruz, E. M., & Braddock, D. T. (2014). dasar molekuler metabolisme sinyal purinergik olehektonukleotida pirofosfatase/fosfodiesterase 4 dan 1 serta implikasinya pada stroke. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), 3294–3306.
 11. Anggraini, R., F, Y. V., & Masruhim, M. A. (2016). Asuhan Keperawatan Pada Sistem Kardivaskuler Dewasa. Yogyakarta: Graha Ilmu. *Terapi Penggunaan Obat Stroke Pada Pasien Stroke Iskemik di RSUD Abdul wahab sjahrane Samarinda*, April 2016, 20–21.
 12. Arifianto. (2014). Klasifikasi Stroke Berdasarkan Kelainan Patologis dengan Learning Vector *Quantiation*. *Eccis*, 8(2), 117–122.
 13. Ayu, A., & Putri, N. (2023). Gambaran epidemiologi stroke di jawa timur tahun 2019-2021 Andina Ayu Natasya Putri. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 7(1), 1030–1036.
 14. Cahyawati, P. N. (2020). Efek farmakologi dan toksik sirsak (*Annona muricata*): A minireview. *Biomedika*, 12(2), 107–116
 15. Chaudhary, S., Godatwar, P., & Sharma, R. (2015). In vitro thrombolytic activity of Dhamasa (*Fagonia arabica* Linn.), Kushta (*Saussurea lappa* Decne.), and Guduchi (*Tinospora cordifolia* Thunb.)
 16. Chugh, C. (2019). Acute ischemic stroke: Management approach. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 23, S140–S146.
 17. Hasmila, I. (2019). Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Fortifikasi Nanokitosan sebagai Antibakteri dan Antioksidan. 11–12.
 18. Ismaulidia, M. F., & Sari, N. and I. purnama. (2021). Bab I Pendahuluan. *Journal Information*, 10(3), 1–16.
 19. Kaliawan, K., & Danardono, P. (2023). Kuantifikasi Senyawa Flavonoid Dengan Lc-Ms/Ms Secara Simultan. *DISTILAT: Jurnal Teknologi Separasi*, 7(1), 66–73.
 20. Kalontong, P. K., Safithri, M., & Tarman, K. (2022). Penambatan molekul senyawa aktif *Spirulina platensis* sebagai inhibitor TMPRSS2 untuk mencegah infeksi sars-cov-2 Putu. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 253–267
 21. Kemenkes RI. (2011). No Title. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 16(2), 39–55.
 22. Kesuma, D., Siswandono, S., Purwanto, B. T., & Hardjono, S. (2018). Uji in silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan N-(Benzoil)-N'- feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *JPSCR : Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 3(1), 1
 23. Tilaqza A, Herbani M. Studi In silico Potensi Anti Hipertensi dan Prediksi Profil Farmakokinetika Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia*. Lamk). *Jurnal Kesehatan Islam* [Internet]. 2021;10(2):45–52. Available from:
 24. Maros, H., & Juniar, S. (2016). *Pustaka_Bab_Page 1-23*. 1–23.
 25. Melia Setiawati, & Adhipireno, P. (2018). *Medica Hospitalia. Perbedaan Fungsi Agregasi Trombosit,MPV,Dan Rasio MPV/PC Pada Pasien Stroke Iskemik Dan Stroke Hemoragik*, 5(Mei 2018), 1–4.
 26. Natalia kote, jessica christy. (2023). efektivitas daun sirsak (*Annona muricata* L) penurun kadar kolesterol. *Journal Transformation of Mandalika*, 4(2), 166–171.
 27. Pinzon, rizaldy taslim. (2016). *awas stroke*. Betha frafika.
 28. Prasiska Wulandari, R., Gabriel, K., Aulia Nurdin, H., Hanna F. Pakhrul, D., Salmandhiya Harits, S., Prameswari, N., Puteri Agustina Pribadi, A., & Lia Aulifa, D. (2023).
 29. Qomaliyah, E. N. (2022). Etnofarmakologi dan Potensi Bioaktivitas Daun dan Buah Sirsak (*Annona Muricata*): Artikel Review. *Biocity Journal of Pharmacy Bioscience and Clinical Community*, 1(1), 36–55.
 30. Rahmawati, R. (2019). *Simplisia dibuat serbuk dengan tujuan untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga senyawa aktif akan* 32. 32–43.
 31. Rasyidah, R., & Hutasuhut, M. (2019). Studi etnobotani dan aktivitas farmakologi daun sirsak (*Annona Muricata* L.). *klorofil: Jurnal Ilmu Biologi Dan Terapan*, 3(1), 10–14.
 32. Savitri. A. Anissa Erika. (2021). Uji aktivitas antiagregasi platelet fraksi n-heksan-etil asetat dari ekstrak etanol akar jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) yang mengandung senyawa terpenoid secara in vitro .
 33. Damayanti I, Ramona Y, Raharjo SJ. Mekanisme Kerja Antibiotik Ceftriaxone, Clarithromycin, dan Senyawa Aktif Quercetin pada *Streptococcus pneumoniae* dengan Metoda Docking In Silico. *Journal of Biological Sciences*. 2022 Mar 31;9(1):1–13.

34. Setiawan et al. (2021). Diagnosis Dan Tatalaksana Stroke Hemoragik. *Jurnal Medika Utama*, 02(01), 402–406.
35. Setyawan, R. (2015). *Kadar Asam Urat pada Model Tikus Hiperurisemia Setelah Pemberian Infusa Daun Sirsak (Annona muricata L.)*. 1–13.
36. Sugiharto, M. I., Bintari, Y. R., & Damayanti, D. S. (2021). Mekanisme Senyawa Aktif Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Sebagai Anti Diabetes : Studi In Silico. *Jurnal Kedokteran Komunitas*, 9(2), 1–13.
37. Sultradewi Kesuma, N. M. T., Krismashogi Dharmawan, D., & Fatmawati, H. (2019). Gambaran faktor risiko dan tingkat risiko stroke iskemik berdasarkan stroke risk scorecard di RSUD Klungkung. *Intisari Sains Medis*, 10(3), 720–729.
38. Susanti, N. M. P., Laksmiani, N. P. L., Noviyanti, N. K. M., Arianti, K. M., & Duantera, I. K. (2019). Molecular Docking Terpinen-4-Ol Sebagai Antiinflamasi Pada Aterosklerosis Secara in Silico.
39. Syahnita, R. (2021). *Modul Biokimia Materi Metabolisme Lemak, Daur Asam Sitrat, Fosforilasi Oksidatif Dan Jalur Pentosa Fosfat*, 6.
40. Tando, E. (2018). Review: Potency of Secondary Metabolite Compounds from Soursop (*Annona muricata*) and Sugar Apple (*Annona squamosa*) as Plant-Based Pesticides for Controlling Pests and Diseases of Plants. *Jurnal Biotropika*
41. Adlamani, V. M. K., Gunasinghe, K. K. J., Chee, X. W., Rahman, T., & Harper, M. T. (2023). Human soluble CD39 displays substrate inhibition in a substrate-specific manner. *Scientific Reports*, 13(1), 1–12.
42. Wahyuni, A. T., & Pratama, J. E. (2019). Profil Terapi Pasien Stroke Iskemik di Instalasi Rawat Jalan Rumah Sakit Umum Pindad Turen. *Dostoral Dissertation, Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang*, 1–13.
43. Wang, L., Wang, J., Xu, J., Qin, W., Wang, Y., Luo, S., & Wang, G. (2021). *The role and molecular mechanism of p2y12 receptors in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. Applied Sciences (Switzerland)*, 11(19).
44. Wijaya, A. K. (2013). Patofisiologi Stroke Non-Hemoragik Akibat Trombus. *E-Jurnal Medika Udayana*, 2(10), 1–14.
45. 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*. 2012 Dec;64:4–17.
46. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem*. 2015 May 14;58(9):4066–72.
47. Yeni Y, Rachmania RA. The Prediction of Pharmacokinetic Properties of Compounds in *Hemigraphis alternata* (Burm.F.) T. Ander Leaves Using pkCSM. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2022;22(4):1081–9.
48. Krihariyani D, Sasongkowati R, Haryanto E. Studi In Silico Sifat Farmakokinetik, Toksisitas, Dan Aktivitas Imunomodulator Brasilein Kayu Secang Terhadap Enzim 3-Chymotrypsin-Like Cysteine Protease Coronavirus. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*. 2020;1(1):76–90.
49. Sevrioukova IF, Poulos TL. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: Recent advances and remaining problems.

