

STUDI *IN SILICO*: ANALISIS POTENSI KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris*) SEBAGAI ANTI-ALZHEIMER DENGAN AKTIVASI ALFA SEKRETASE DAN PENGHAMBATAN BETA SEKRETASE

Jovi Alkhadavi Hidayatullah, Anita Puspa Widiyana, Dini Sri Damayanti*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) mengandung berbagai senyawa aktif yang berpotensi sebagai Anti-alzheimer. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi potensi senyawa aktif kacang merah sebagai anti-alzheimer dengan mekanisme aktivasi alfa sekretase dan menghambat beta sekretase, serta memprediksi efektivitas, kelarutan, dan keamanan secara *in silico*.

Metode: Penelitian dilakukan secara komputasi. Afinitas senyawa aktif biji kacang merah terhadap protein alfa sekretase dan beta sekretase diukur menggunakan *docking server* yang dibandingkan dengan kontrol atorvastatin dan atabecestat. Uji prediksi sifat farmakokinetik, fisikokimia dan toksisitas menggunakan pkCSM. Analisa dilakukan secara diskriptif analitik dan validasi penambatan molekul berdasarkan *Root Mean Square Deviation* kurang dari 2 angstrom.

Hasil: Senyawa aktif memiliki afinitas yang tinggi terhadap alfa sekretase antara lain Beta-sitosterol (ΔG -7,28 kkal/mol), Delphinadn (ΔG -5,42 kkal/mol), Bochanin A (ΔG -5,21 kkal/mol) dengan persentase kesamaan asam amino Beta-sitosterol 85%, Delphinadin 28%, Biochain A 57%. Senyawa aktif yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap beta sekretase antara lain Beta-sitosterol (ΔG -10,19 kkal/mol), Delphinadin (ΔG -7,13 kkal/mol), Cyanidin (ΔG -7,07 kkal/mol) dengan persentase kesamaan asam amino Beta-sitosterol 54%, Delphinadin 36%, Cyanidin 36%. Hasil prediksi sifat fisikokimia senyawa aktif memenuhi aturan lipinski. Prediksi sifat farmakokinetik didapatkan nilai absorpsi intestinal rata-rata diatas 90%, permeabilitas Caco2 rata-rata diatas 0,9, VDss rata-rata diatas 0,1, BBB rata-rata diatas -1, CLTOT rata-rata 0,2 dan tidak berpotensi hepatotoksik.

Kesimpulan: Senyawa aktif biji kacang merah mempunyai potensi sebagai Anti-alzheimer dengan mengaktifkan alfa sekretase dan menghambat beta sekretase yaitu Beta-sitosterol, Delphinadin, Cyanidin, Biochanin A. Keempat senyawa tersebut larut dalam air, mempunyai farmakokinetik yang bagus dan tidak bersifat toksik.

Kata Kunci : *Anti-alzheimer; Phaseolus vulgaris; in silico.*

STUDY *IN SILICO*: ANALYSIS POTENTIAL KIDNEY BEAN (*Phaseolus vulgaris*) AS ANTI-ALZHEIMER WITH ACTIVATION OF ALFA SECRETASE AND INHIBITION OF BETA SECRETASE

Jovi Alkhadavi Hidayatullah, Anita Puspa Widiyana, Dini Sri Damayanti
Faculty of Medicine University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) contains various of active compounds, that have the potential as Anti-alzheimer's. This study aims to predict the potential of kidney bean active compounds as anti-alzheimer's with mechanism activation alpha secretase and inhibit beta secretase, and also to predict the effectiveness, solubility, and safety using *in silico* method.

Method: This research is computationally study. The affinity of the kidney bean's active compound seeds for protein alpha secretase and beta secretase was measured using a docking server and will be compared with atorvastatin and atabecestat controls. Pharmacokinetic's prediction test, physicochemical and toxicity profiles using pkCSM. The model for analysis is using analytical descriptive and validation of molecular anchoring is based on Root Mean Square Deviation of less than 2 angstroms.

Results: The active compounds have high affinity for alpha secretase is Beta-sitosterol (ΔG -7,28 kcal/mol), Delphinadn (ΔG -5,42 kcal/mol), Bochanin A (ΔG -5,21 kcal/mol) with the percentage of amino acid equation Beta-sitosterol 85%, Delphinadin 28%, Biochain A 57%. The active compounds have high affinity for beta-secretase is Beta-sitosterol (ΔG -10,19 kcal/mol), Delphinadin (ΔG -7,13 kcal/mol), Cyanidin (ΔG -7,07 kcal/mol) with the percentage of amino acid equation Beta-sitosterol 54%, Delphinadin 36%, Cyanidin 36%. The results of the prediction of the physicochemical profiles of the four active compounds complied with lipinski's rule. Prediction of pharmacokinetic properties obtained an average intestinal absorption value above 90%, Caco2 permeability on average above 0.9, VDss average above 0.1, BBB average above -1, CLTOT average 0.2 and all the active compound is not potentially hepatotoxic.

Conclusion: The active compounds of kidney bean seeds has a potential to be an anti-alzheimer's by activating alpha secretion and inhibiting beta secretase which is Beta-sitosterol, Delphinadin, Cyanidin, Biochanin A. These four compounds are soluble in water, have good pharmacokinetics and are not potentially hepatotoxic.

Keywords: *Anti-alzheimer; Phaseolus vulgaris; in silico*

*Correspondence:

Dini Sri Damayanti

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Address: Jl MT Haryono 193 Malang City, East Java Indonesia, 65145

Email: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) merupakan salah satu tanaman golongan kacang-kacangan yang memiliki banyak kandungan senyawa aktif diantaranya Genistein, Daizein, Glisitein, Antosianin, Beta-Sitosterol⁽¹⁾. Senyawa aktif kacang merah diketahui bermanfaat pada penyakit degeneratif sebagai antidiabetes dan antihipertensi^(2,3). Namun kacang merah masih belum banyak diteliti sebagai Anti-alzheimer. Menurut beberapa penelitian sebelumnya senyawa aktif isoflavon berpotensi sebagai Anti-alzheimer yang dilakukan secara *in vitro* senyawa aktif isoflavon dengan menggunakan analisis spektroskopi fluoresensi terhadap amiloid beta oligomer didapatkan hasil penghambatan signifikan dalam enam hari. Penelitian tersebut didapatkan kesimpulan senyawa aktif dapat menghambat beta sekretase sebagai enzim yang berperan dalam patofisiologi Alzheimer⁽⁴⁾.

Patofisiologi Alzheimer antara lain diperankan oleh alfa sekretase dan beta sekretase. Aktivitas enzim alfa sekretase memotong *amyloid precursor protein* (APP) pada rantai C-terminal menjadi fragmen-fragmen yang bersifat larut dalam sitoplasma sehingga beresiko rendah untuk membentuk plak amiloid. Sedangkan beta sekretase memotong APP pada C-terminal menjadi amiloid beta monomer yang sifatnya tidak larut dalam sitoplasma. Tiap tiap amiloid beta monomer akan saling berikatan membentuk amiloid beta oligomer dan beragregasi pada celah sinap membentuk plak amiloid (*senile plaque*)⁽⁵⁾. Alfa sekretase dan beta sekretase saling berkorelasi dan berperan penting dalam pemotongan APP pada awal patofisiologi Alzheimer, Alzheimer utamanya terbentuk oleh akumulasi plak amiloid di ekstraseluler dan *neurofibrillary tangles* di intraseluler dikarenakan pemotongan APP yang lebih dominan dilakukan oleh beta sekretase dibandingkan alfa sekretase, penghambatan aktivitas dari beta sekretase dan peningkatan aktivitas alfa sekretase adalah mekanisme yang bisa digunakan untuk penemuan calon obat sebagai Anti-alzheimer⁽⁶⁾.

Penemuan obat baru sebagai Anti-alzheimer didasari pada terapi Alzheimer untuk saat ini hanya berbasis pengobatan medikamentosa untuk menghambat dari perkembangan Alzheimer, pilihan utama

adalah golongan acetylcholinesterase inhibitor (AChEI)⁽⁹⁾. Namun pengobatan AChEI memiliki kontraindikasi dan efek samping seperti hepatotoksik⁽¹⁰⁾.

Adanya efek samping pengobatan Alzheimer dan potensi senyawa aktif kacang merah sebagai calon obat herbal Anti-alzheimer perlu diteliti lagi. Pada Penelitian ini akan menguji potensi senyawa aktif kacang merah sebagai anti-alzheimer dengan 2 tahapan diantaranya tahap pertama bertujuan untuk mengetahui afinitas ikatan senyawa aktif kacang merah menghambat protein beta sekretase, dan mengaktifkan alfa sekretase menggunakan *dockingserver* dengan pembandingan obat kontrol atorvastatin dan atabecestat. Pemilihan atorvastatin sebagai pembandingan protein alfa sekretase dikarenakan pada penelitian sebelumnya pemberian atorvastatin terhadap sel neuroblastoma yang diinjeksikan mutasi APP, didapatkan hasil peningkatan pemotongan APP yang dominan dengan aktivasi alfa sekretase⁽¹⁶⁾. Sedangkan untuk beta sekretase menggunakan kontrol obat atabecestat dikarenakan pada penelitian sebelumnya pemberian atabecestat pada orang lanjut usia dengan metode double-blind menggunakan placebo selama dua minggu dengan parameter biomarker Alzheimer (A β total, sAPPa) didapatkan hasil penurunan konsentrasi plak amiloid⁽²²⁾. Tahap kedua bertujuan untuk memprediksi sifat fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitasnya menggunakan software *pkCSM online tools*^(11,12).

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *in silico* dengan melakukan penambatan molekul, prediksi sifat fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas senyawa aktif kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) yang terdiri dari Genistein, Daizein, Glisitein, Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, Biochanin A, dan Formononetin.

Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan oktober sampai dengan november 2021 di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Alat

Perangkat Laptop dengan spesifikasi processor Intel(R) Core(TM) i5-7200U CPU 2.50 GHz, 4GB.RAM, sistem operasi Windows 10 Pro 64-bit, koneksi internet, *website docking server* pada <http://www.dockingserver.com> dengan spesifikasi program autodoc4 visualisasi ligPlot+, pkCSM *online tool* pada <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm> dan penghitungan reabilitas dengan aplikasi IBM SPSS 25.

Bahan

Struktur 3D senyawa aktif kacang merah yang terdiri dari Genistein, Daizein, Glisitein, Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, Biochanin A, dan Formononetin didapatkan dari PubChem dan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya⁽¹²⁾. Struktur protein target alfa sekeretase (6BE6) dan beta sekretase (1W51) yang digunakan didapatkan dari protein data bank.

Uji Penambatan Molekul Senyawa Aktif Kacang Merah terhadap Alfa Sekeretase dan Beta Sekretase

Proses sebelum penambatan molekul adalah melakukan tes ketepatan (validasi) dengan melakukan penambatan antara protein target dengan obat kontrol dan konsistensi nilai hasil (realibilitas) dengan melakukan pengulangan docking sebanyak 16 kali dan pengolahan data melalui SPSS.

Proses awal penambatan molekul adalah pengunduhan ligan senyawa aktif dan obat kontrol pada Pubchem, pengunduhan protein target alfa sekretase dan beta sekretase pada Protein Data Bank. Proses selanjutnya dilakukan preparasi protein menggunakan Biovia untuk menghilangkan molekul air dan ligan.

Ligan dan Protein yang diunduh kemudian dilakukan penambatan molekul menggunakan *docking server* dengan mengupload berkas ligan dan protein target dan memulai penambatan pada menu *start docking*.

Proses penambatan memperhatikan ukuran gridbox dengan rincian pada **tabel 1**.

Tabel 1. Ukuran Grid Box

	Alfa Sekretase	Beta Sekretase
nx	20	20

ny	15	20
nz	20	20
cx	77.88	66.91
cy	50.31	47.55
cz	7.32	7.74

Keterangan: pada saat penambatan molekul memperhatikan ukuran grid box pada masing masing protein target.

Prediksi Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa Aktif Kacang Merah terhadap Alfa Sekeretase dan Beta Sekretase

Proses prediksi sifat farmakokinetik, fisikokimia dan toksisitas menggunakan pkCSM *online tool*. Langkah awal adalah menyalin Kode Smile yang ada pada Pubchem kemudian ditempelkan pada kolom kode yang tertera pada web kemudian menekan ADMET. Hasil yang disajikan dilakukan analisis sesuai dengan parameter masing masing.

Teknik Analisis Data

Hasil uji validitas dengan melihat nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) kurang dari 2 angstrom. Uji realibilitas dengan melihat hasil reabilitas dikatakan tinggi jika hasil *Alpha Cronbach* (R_{hitung}) lebih besar dibanding dengan level signifikan 5% distribusi nilai tabel (R_{tabel}) yang sudah ditetapkan yaitu 0.44, atau R_{hitung} harus lebih besar dari 0,6⁽¹³⁾.

Hasil penambatan molekul diamati dengan parameter energi ikatan bebas, konstanta inhibisi, interaksi luas permukaan dan residu asam amino antara ligan dan protein target dibandingkan dengan obat kontrol.

Hasil prediksi sifat fisikokimia diamati dengan aturan lima lipinski yang berisi parameter massa molekul, kestabilan ikatan hidrogen dan lipofilisitas.

Hasil Prediksi Sifat Farmakokinetik diamati berdasarkan profil Absorpsi dengan parameter absorpsi intestinal, permeabilitas Caco2. Profil Distribusi dengan parameter *Volume Distribusi Steady State* (VDss), permeabilitas *Blood Brain Barrier* (BBB). Profil Metabolisme dengan parameter CYP2D6 dan CYP3A4 inhibitor. Profil Ekskresi dengan parameter *Clearance Total* (CLTOT).

Hasil Prediksi Sifat Toksisitas dievaluasi berdasarkan parameter resiko hepatotoksik.

HASIL PENELITIAN

Hasil Data Uji Validitas dan Realibilitas Penambatan Molekul

Hasil penambatan molekul alfa sekretase dengan atorvastatin didapatkan nilai 0,99 Å,

dan beta sekretase dengan atabecestat didapatkan nilai 1,68 Å. Hasil Reabilitas senyawa aktif dengan protein target alfa sekretase didapatkan hasil R_{hitung} 0,96, sedangkan pada protein target beta sekretase didapatkan hasil R_{hitung} 0,99.

Tabel 2. Hasil Pengulangan 8 Kali Validasi

	RMSD 1	RMSD 2	RMSD 3	RMSD 4	RMSD 5	RMSD 6	RMSD 7	RMSD 8	Rata-rata	Standar Deviasi
Alfa Sekretase dengan Atorvastatin	0,99	1,20	1,56	0,96	1,11	1,24	1,20	1,00	1,15	0,19
Beta Sekretase dengan Atabecestat	1,68	1,70	1,88	1,68	1,73	1,59	1,97	1,87	1,76	0,12

Keterangan: Data validitas dikatakan valid jika nilai RMSD rata-rata pengulangan kurang dari 2 Å

Tabel 3. Hasil Pengulangan 16 Kali Senyawa Aktif dan Obat Kontrol terhadap Protein Target

Nama senyawa	Energi Ikatan Bebas (kkal/mol)															
	per1	per2	per3	per4	per5	per6	per7	per8	per9	per10	per11	per12	per13	per14	per15	per16
atorvastatin	5,87	5,36	5,07	4,95	4,88	4,72	4,74	6,74	6,20	5,95	5,84	5,82	5,43	5,30	5,06	5,02
genistein	5,53	6,14	6,14	5,57	5,54	6,26	6,11	5,74	5,37	5,32	5,36	5,34	5,99	5,94	5,87	5,68
glisitein	6,06	6,48	5,58	5,35	5,39	6,85	6,63	6,47	6,33	5,98	5,44	5,14	5,90	5,84	5,71	5,61
daidzein	4,72	4,85	5,19	5,34	6,16	5,71	5,67	5,34	5,13	5,02	4,85	4,81	4,72	6,19	5,75	5,70
cyanidin	4,88	4,87	4,97	5,34	5,71	4,76	5,94	5,94	5,56	5,30	4,87	4,86	5,72	5,66	4,84	4,81
delphinadin	5,42	5,07	6,38	6,66	4,95	4,87	4,85	4,81	4,76	4,70	5,33	5,16	5,13	5,07	6,38	6,66
betasitosterol	7,28	6,95	7,22	7,69	9,42	7,41	7,35	7,33	7,12	7,12	6,89	7,05	6,83	7,01	7,33	7,41
biochanin A	5,21	4,77	4,63	4,58	6,12	5,38	5,35	5,65	5,14	5,10	4,96	6,98	6,10	5,88	5,65	5,52
formonetin	4,78	4,50	6,15	5,92	5,78	5,24	4,92	4,84	4,76	4,76	4,60	4,76	4,50	4,44	4,42	5,24
Nilai Alpha Cronbach (R_{hitung}) Alfa sekretase										0,96						
Syarat Reabilitas (R_{tabel})										> 0,60						
atabecestat	10,19	10,08	9,73	9,59	9,75	10,16	9,02	9,07	10,14	10,04	9,87	9,75	9,67	9,45	9,67	9,48
genistein	6,53	6,14	6,14	5,57	5,54	6,45	6,14	6,75	6,75	5,87	5,87	6,14	6,14	6,11	6,12	6,50
glisitein	4,91	4,76	4,52	4,39	4,31	6,31	6,28	6,24	6,12	5,65	6,45	6,27	6,19	5,95	5,95	4,91
daidzein	6,29	5,84	5,80	5,68	6,27	5,90	5,83	5,61	6,31	5,92	5,80	5,65	6,24	5,58	5,80	5,67
cyanidin	7,07	6,49	6,07	5,99	5,36	5,10	5,04	7,07	6,48	6,25	6,12	7,07	6,23	6,16	5,54	4,87
delphinadin	7,13	6,16	5,93	5,84	5,43	5,41	5,63	7,13	6,11	5,86	5,61	5,92	5,21	6,20	7,18	7,15
betasitosterol	10,02	9,78	9,75	9,69	9,51	9,51	10,11	10,12	9,31	9,44	9,46	9,47	10,05	10,12	9,75	9,69
biochanin A	6,66	6,35	6,06	5,99	6,76	6,64	6,19	6,04	5,98	6,73	6,65	6,30	6,10	6,65	6,21	5,89
formonetin	6,45	6,38	6,04	6,01	6,37	6,00	6,00	5,71	6,37	6,01	5,99	5,63	6,37	6,29	6,00	5,98
Nilai Alpha Cronbach (R_{hitung}) Beta Sekretase										0,99						
Syarat Reabilitas (R_{tabel})										> 0,60						

Keterangan: Data reliabilitas (nilai Cronbach's alpha 0,00-0,20= kurang reliabel; 0,21-0,40= sedikit reliabel; 0,41-0,60= cukup reliabel; 0,61-0,8= reliabel; 0,81-1,00= sangat reliabel)

Hasil Data Penambatan Molekul Senyawa Kacang Merah dengan Alfa Sekretase dan Beta Sekretase

Hasil penambatan senyawa aktif kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) diantaranya Genistein, Daidzein, Glisitein, Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, Biochanin A, dan

Formononetin dengan parameter yang digunakan untuk menilai afinitas ikatan yaitu energi ikatan bebas, konstanta inhibisi, luas permukaan dan persentase residu asam amino. Penambatan molekul senyawa aktif dengan kontrol atorvastatin terhadap protein alfa sekretase didapat 3 senyawa terbaik yaitu Beta-

sitosterol, Delphinidin, Biochanin A sesuai pada **Tabel 4**. Sedangkan penambatan molekul senyawa aktif terhadap beta sekretase dengan obat kontrol atabecestat didapat 3 senyawa terbaik yaitu Beta-sitosterol, Delphinidin, Cyanidin sesuai pada **Tabel 5**.

Tabel 4. Hasil Energi Ikatan Bebas (ΔG), Konstanta Inhibisi (KI), Interaksi Luas Permukaan, dan Residu Asam Amino Senyawa Aktif Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*.) dan Atorvastatin terhadap Alfa Sekretase

Ligan	Energi ikatan bebas (kcal/mol)	Interaksi Permukaan (Å)	Residu Asam Amino	Persamaan residu asam amino dibanding Atorvastatin(%)
Atorvastatin	-5,87	714,61	Hidrogen: ASN288	100
			Hydrophobik: PRO289 Lain-lainnya: ARG276, GLN307, GLU306, THR287, ASN278	
Beta-sitosterol	-7,28	778,55	Polar: ASP285, ASP282	85
			Hidrofobik: PRO289 , LEU303, PHE290 Lain-lainnya : THR287, ARG276, ASN288, GLU306, GLN307	
Delphinadin	-5,42	614,83	Polar: ARG276, ASN278, TYR225, ARG274, ASP577, LYS480, ASP282	28
Biochanin A	-5,21	604,90	Hidrogen: THR287	57
			Polar: ARG276, GLN227, ASP285	
			Hidrofobik: PHE290, VAL317 Lain-lainnya : PRO289, ASN 288, ASN278	
Glisitein	-4,91	575,18	Hidrogen: THR287	85
			Polar: ARG276, GLN307 Hidrofobik: PHE290, PRO289 Lain-lainnya: ASN288, GLN277, ASP229, VAL317, ASN278	
Cyanidin	-4,88	590,49	Polar: ARG276, ARG274, ASP477, ARG239, LYS480, TYR225, ASN278, ASP282	28
Formononetin	-4,78	584,27	Lain-lainya: GLN478	42
			Polar: ARG276, ASN278, THR287	
			Hidrofobik: PHE290, VAL317 Lain-lainnya : ASN288, GLN227, GLN307, ASP229	
Genistein	-4,71	567,94	Polar: ARG276, GLN307, ASP285, THR287, ASN278	57
			Hidrofobik: PHE290 Lain-lainya: ASN288, GLN227, PRO289, ASP229	
Daizein	-4,68	593,05	Polar: ASN288, GLN307, ASP282, ASP287, THR287, GLU306	85
			Hidrofobik: PHE290, PRO289 Lain-lain: ASN278	

Keterangan: Data hasil penambatan molekul senyawa aktif terhadap alfa sekretase. Penelitian menggunakan pendekatan obat pembeding, sehingga residu asam amino senyawa aktif (teks bold) dianggap sebagai sisi aktif dari protein target sama seperti residu asam amino obat.

Tabel 5. Hasil Analisis Energi Ikatan Bebas (ΔG), Konstanta Inhibisi (KI), Nilai Interaksi Permukaan, dan Residu Asam Amino Senyawa Aktif Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris.*) dan Atabecestat terhadap Beta Sekretase

Ligan	Energi ikatan bebas (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (uM)	Interaksi Permukaan (Å)	Residu Asam Amino	Persentase residu asam amino dibanding Atabecestat(%)
Atabecestat	-10,19	33,82	815,57	Hidrogen: GLY230, GLN73, THR232 Halogen: THR72 Polar: ARG235 Hidrofobik: LEU30, PHE108, ILE110, TRP115, ILE118 Lain-lainnya: THR231	100
Beta-sitosterol	-10,02	45,36	863,35	Hidrofobik: TYR71, ILE110, PHE108, TRP15, LEU30, ILE118 Lain-lainnya : GLN73, LYS107, ASP32, THR72, ASP228	54
Delphinadin	-7,13	5,95	774,74	Hidrogen: TYR198 Polar: THR72, ASP32, SER35, THR232, LYS224 Hidrofobik: TYR71 Lain-lain: ASP228, GLN73, LEU30	36
Cyanidin	-7,07	6,58	761,68	Hidrogen: TYR198 Polar: THR72, ASP32, SER35, THR232 Hidrofobik: TYR71 Lain-lainnya: ASP228, GLN73, LEU30	36
Biochanin A	-6,66	13,17	713,14	Hidrogen: THR231, THR329 Polar: ASP228, THR72, ARG235, LYS224 Hidrofobik: TYR71, TYR198, ILE226, VAL332, PHE108, ILE118 Lain-lainnya : ASP32	54
Genistein	-6,53	16,28	664,18	Hidrogen: THR329, TYR198 Polar: ARG128, THR72, ASN37, THR232, ASP228, SER327 Hidrofobik: TYR71, ILE126, VAL69 Lain-lainnya: SER35, VAL332	18
Formononetin	-6,45	18,57	679,87	Hidrogen: TYR198, THR232 Polar: ARG128, ASN37, SER327 Hidrofobik: TYR71, ILE126, VAL69, VAL332 Lain-lain: THR72, SER35, ASP228	18
Daizein	-6,29	24,48	646,50	Hidrogen: TYR198, THR232 Polar: ARG128, ASN37 Hidrofobik: TYR71, ILE126, VAL69 Lain-lain: THR72, SER35, VAL332, ASP228	18
Glisitein	-4,91	24,40	729,96	Polar: THR72, ASP32, ASP228 Cation-pi: PHE108, TYR198, TRP115 Hidrofobik: TYR71 Lain-lainnya: GLN73, THR232, ILE118, ILE226	54

Keterangan: Data hasil penambatan molekul senyawa aktif terhadap beta sekretase. Penelitian menggunakan pendekatan obat pembanding, sehingga residu asam amino senyawa aktif (teks bold) dianggap sebagai sisi aktif dari protein target sama seperti residu asam amino obat.

Hasil Uji Sifat Fisikokimia Senyawa Aktif Kacang Merah

Hasil prediksi sifat fisikokimia dari senyawa aktif kacang merah didapatkan

Genistein, Daizein, Glisitein, Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, Biochanin A, dan Formononetin memenuhi aturan lipinski dapat dilihat pada **tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Prediksi Sifat Fisikokimia Senyawa Aktif Kacang Merah

Nama Senyawa	CID	Rumus Kimia	Parameter <i>Lipinski Rule Of Five</i>				Interprestasi
			BM	LogP	HBA	HBD	
Genistein	5280961	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,24	2,57	5	3	Ya
Glisitein	5317750	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26	2,87	5	2	Ya
Daizein	5281708	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,24	2,87	4	2	Ya
Cyanidin	128861	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287,24	2,90	5	5	Ya
Delphinadin	68245	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇	338,69	2,38	5	6	Ya
Beta -sitosterol	222284	C ₂₉ H ₅₀ O	414,71	8,02	1	1	Ya
Biochanin A	5280373	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,26	2,87	5	2	Ya
Formononetin	5280378	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,26	3,17	4	1	Ya

Keterangan: Data yang diperlihatkan merupakan hasil uji prediksi sifat fisikokimia kacang merah dengan parameter menurut aturan lipinski meliputi Berat Molekul (BM), Lipofilisitas (LogP), *Hydrogen bond acceptor* (HBA), *Hydrogen bond donor* (HBD).

Hasil Uji Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa Aktif Kacang Merah

Hasil prediksi farmakokinetik (ADME) dan Toksisitas dari senyawa aktif kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) meliputi profil Absorbsi,

Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, Toksisitas didapatkan senyawa aktif yang memenuhi semua profil parameter yaitu Genistein, Glisitein, Daizein, Beta-sitosterol, Biochanin A, Formononetin dilihat pada **tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa Aktif Kacang Merah

Nama senyawa	Absorbsi		Distribusi		Metabolisme		Ekskresi	Toksisitas
	AI (%)	Per. Caco2 (10 ⁻⁶ cm/s)	Vdss (Log L/Kg)	BBB (log BB)	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	CLTOT (log ml/min/kg)	Hepatotoksik
Genistein	93,38	0,9	0,09	-0,71	Tidak	Tidak	0,15	Tidak
Glisitein	94,68	1,17	-0,04	-0,32	Tidak	Tidak	0,20	Tidak
Daizein	94,83	0,93	-0,17	-0,06	Tidak	Tidak	0,16	Tidak
Cyanidin	87,30	-0,35	0,95	-1,23	Tidak	Tidak	0,53	Tidak
Delphinadin	61,91	-0,32	0,96	-1,28	Tidak	Tidak	0,57	Tidak
Beta-sitosterol	94,46	1,20	0,19	0,78	Tidak	Tidak	0,62	Tidak
Biochanin A	93,02	0,89	-0,34	-0,22	Tidak	Tidak	0,24	Tidak
Formononetin	96,11	1,25	-0,12	0,15	Tidak	Tidak	0,25	Tidak

Keterangan: Data yang diperlihatkan merupakan hasil uji prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas senyawa aktif kacang merah menggunakan parameter absorpsi intestinal (AI), permeabilitas Caco2 (Per. Caco2), *Volume distribution steady state* (Vdss), *Blood Brain Barrier* (BBB), sitokrom P450 (CYP2D6, CYP3A4) inhibitor, *Clearance Total* (CLTOT), Hepatotoksik.

PEMBAHASAN

Uji Validasi Dan Reabilitas

Uji validasi alfa sekretase dengan atorvastatin didapatkan nilai 0,99 Å, dan beta sekretase dengan atabecostat didapatkan nilai 1,68 Å. Dikatakan valid dikarenakan nilai dibawah 2 Å, RMSD merupakan parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah proses penambatan

untuk mengetahui nilai penyimpangannya⁽¹⁴⁾. Uji validasi diperlukan untuk meningkatkan kualitas dan ketepatan dalam proses penambatan molekul. Uji reabilitas sangat baik dikarenakan nilai R_{hitung} diatas 0,6. Uji reabilitas berfungsi untuk melihat konsistensi hasil penelitian jika dilakukan pengulangan. Uji reabilitas bertujuan untuk penelitian lanjutan tidak terjadi perbedaan nilai hasil yang tidak jauh berbeda⁽¹³⁾.

Penambatan Molekul Senyawa Aktif Kacang Merah terhadap Alfa Sekretase

Hasil penambatan molekul yang dilakukan, didapatkan nilai energi ikatan bebas dari atorvastatin dengan protein alfa sekretase didapatkan nilai ΔG -4,87 kkal/mol, luas interaksi permukaan 714,61 Å, jumlah residu asam amino yang terbentuk dari ikatan tersebut ada 6 dan 1 ikatan hidrogen.

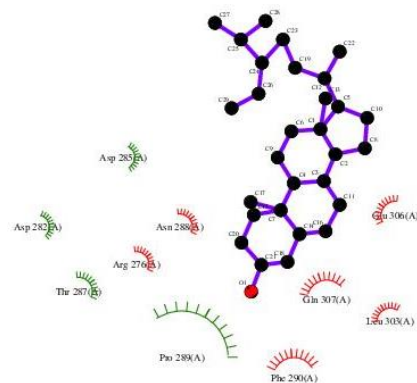
Parameter yang digunakan untuk mengukur afinitas ikatan senyawa diantaranya energi ikatan bebas (ΔG), konstanta inhibisi (KI), luas interaksi permukaan dan residu asam amino. Dimana energi ikatan bebas adalah besarnya energi yang dilepaskan oleh suatu senyawa untuk berikatan dengan protein target, semakin rendah nilai yang ditunjukkan, maka semakin besar energi yang dilepaskan untuk berikatan, sehingga ikatan antara senyawa aktif dan protein target semakin kuat dan stabil. Konstanta inhibisi adalah konsentrasi minimal senyawa agar dapat menghambat dari aktivitas protein target, semakin kecil nilai KI maka potensi senyawa menghambat aktivitas protein target semakin baik. Luas interaksi permukaan adalah luas permukaan senyawa dalam mengikat protein target, semakin tinggi nilai luas interaksi permukaan maka akan semakin banyak senyawa mengikat residu asam amino pada protein target. Residu asam amino adalah digunakan untuk mengikat ligan atau senyawa, dengan sisi aktif protein berbeda tiap asam amino yang diikat, Persamaan residu asam amino antara senyawa dengan kontrol menunjukkan potensi kesamaan sisi aktif^(14,15)

Pada Penelitian ini menggunakan atorvastatin sebagai kontrol protein alfa sekretase berdasarkan penelitian sebelumnya pemberian atorvastatin pada sel neuroblastoma yang diinjeksikan mutasi APP, menunjukkan hasil peningkatan pemotongan APP yang larut dalam sitoplasma (sAPP α) dibandingkan dengan beta monomer⁽¹⁶⁾.

Alfa sekretase adalah enzim proliolitik yang dapat memotong APP menjadi sAPP α dan P3 yang memiliki sifat neurotropik dan neuroprotektif. Hal ini disebabkan karena hasil pemecahan APP bersifat larut dan mudah di *clearance* di sitoplasma. Aktivasi dari enzim alfa sekretase menjadi metode yang bisa dikembangkan untuk penemuan calon baru sebagai anti-alzheimer⁽⁶⁾.

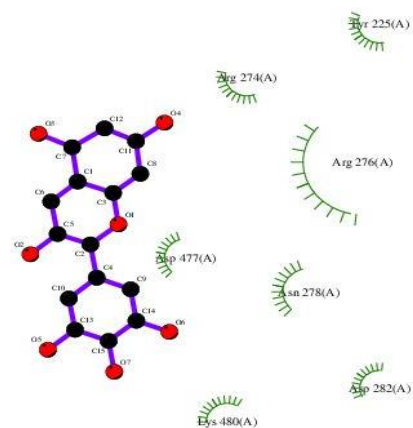
Biji kacang merah dari hasil penelitian sebelumnya diduga memiliki potensi sebagai anti-alzheimer. Hasil penelitian secara *in silico* didapatkan bahwa semua senyawa aktif biji kacang merah yang diidentifikasi memiliki afinitas yang tinggi terhadap alfa sekretase. 3 senyawa aktif terbaik yaitu beta sitosterol, delphinidin, dan biochanin A.

Senyawa beta-sitosterol adalah senyawa golongan fitosterol yang memiliki gugus OH, dan adanya atom C pada gugus etil sebagai bagian non-polar⁽¹⁹⁾, memiliki energi bebas ΔG -7,28 kkal/mol, luas interaksi permukaan 777,55 Å dan persentase persamaan residu asam amino 60% dibandingkan dengan atorvastatin.



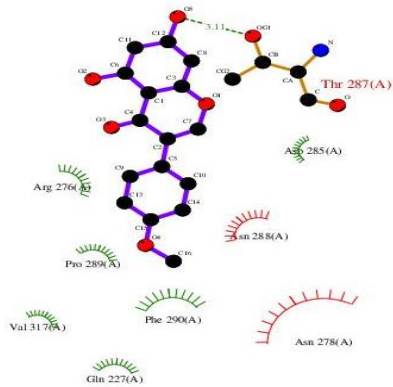
Gambar 1. Interaksi Beta-sitosterol dengan Alfa Sekretase

Senyawa aktif terbaik kedua yaitu Delphinidin adalah senyawa termasuk dalam golongan antosianin yang memiliki gugus dua cincin aromatic benzene⁽²⁰⁾. Memiliki energi bebas ΔG -5,42 kkal/mol, luas interaksi permukaan 614,83 Å dan persentase persamaan residu asam amino 28% dibandingkan atorvastatin.



Gambar 2. Interaksi Delphinidin dengan Alfa Sekretase

Senyawa aktif terbaik ketiga yaitu Biochanin A adalah senyawa termasuk dalam senyawa golongan isoflavon yang memiliki gugus hidroksil dengan gugus ester⁽²¹⁾. Memiliki energi bebas ΔG -5,21 kkal/mol, Luas interaksi permukaan 604,90 Å, dengan persentase persamaan asam amino 44% dibandingkan atorvastatin.



Gambar 3. Interaksi Biochanin A dengan Alfa Sekretase

Dari keseluruhan hasil dapat disimpulkan bahwa ketiga senyawa aktif biji kacang merah di prediksi memiliki potensi tinggi sebagai anti-alzheimer dengan 3 senyawa aktif terbaik yaitu Beta-sitosterol, Delphinadin, Biochanin A. Ketiga senyawa tersebut di prediksi berikatan terhadap protein target alfa sekretase, sehingga pemecahan APP dominan menjadi sAPP α dan P3 yang bersifat larut dalam sitoplasma dan mencegah dari pembentukan plak.

Penambatan Molekul Senyawa Aktif Kacang Merah terhadap Beta Sekretase

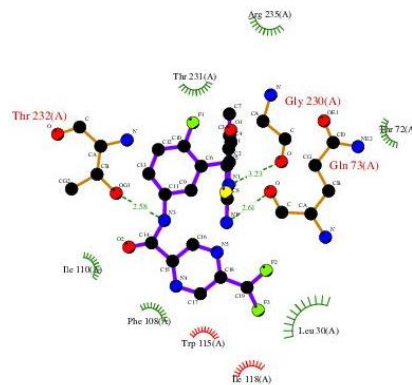
Hasil penambatan molekul yang dilakukan, didapatkan nilai energi bebas dari atabecestat dengan protein target beta sekretase didapatkan nilai ΔG -10,08 kkal/mol, nilai Ki 33,82 μ M, nilai luas interaksi permukaan 815,57 Å dan jumlah residu asam amino yang terbentuk dari ikatan tersebut ada 11 dan 3 ikatan hidrogen.

Hasil penelitian sebelumnya secara *in vivo* membuktikan bahwa pemberian atabecestat pada orang lanjut usia, dengan metode *double-blind* menggunakan placebo, yang diberikan selama dua minggu, didapatkan hasil penurunan konsentrasi A β , dan peningkatan dari sAPP α . Hasil penelitian tersebut menyimpulkan bahwa atabecestat (JNJ 54861911) mampu menghambat terjadinya Alzheimer melalui mekanisme sebagai beta sekretase (BACE-1) inhibitor⁽²²⁾.

Beta sekretase adalah enzim proliolitik yang dapat memotong APP menjadi beta monomer yang memiliki sifat sulit larut dalam sitoplasma sehingga beresiko membentuk plak amiloid. Penghambatan dari enzim beta sekretase menjadi metode yang bisa dikembangkan untuk penemuan calon obat baru sebagai anti-alzheimer⁽⁶⁾.

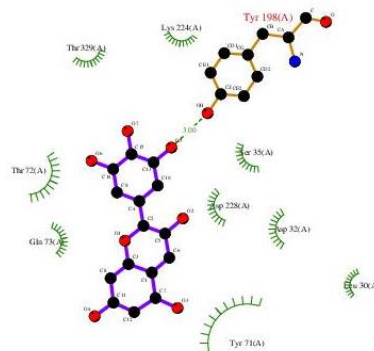
Senyawa aktif biji kacang merah yang diidentifikasi memiliki afinitas yang tinggi terhadap beta sekretase, adalah beta sitosterol, delphanadin, dan cyanidin.

Senyawa beta-sitosterol adalah senyawa kacang merah yang paling berpotensi sebagai anti-alzheimer dengan energi bebas ΔG -10,02 kkal/mol, KI 45,36 μ M, luas interaksi permukaan 863,35 Å, dengan persentase persamaan asam amino 60% dibandingkan atabecestat.



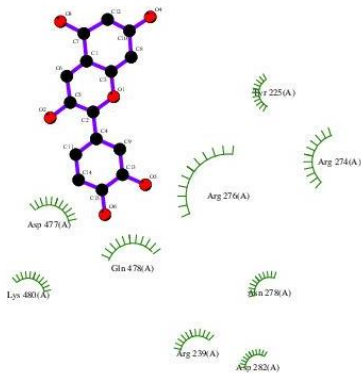
Gambar 4. Interaksi Beta-sitosterol dengan Beta Sekretase

Senyawa aktif terbaik kedua yaitu Delphinadin dengan energi bebas ΔG -7,13 kkal/mol, konstanta inhibisi 5,95 μ M, Luas interaksi permukaan 774,74 Å, dengan persentase persamaan asam amino 33% dibandingkan atabecestat.



Gambar 5. Interaksi Delphinadin dengan Beta Sekretase

Senyawa aktif terbaik ketiga yaitu Cyanidin termasuk dalam golongan antosianin dengan gugus tunggal cincin aromatic benzene⁽²⁰⁾. memiliki energi bebas ΔG -7,07 kkal/mol, konstanta inhibisi 6,58 μM , Luas interaksi permukaan 761,68 \AA , dengan persentase persamaan asam amino 38% dibandingkan atabecestat.



Gambar 6. Interaksi Cyanidin dengan Beta Sekretase

Dari keseluruhan hasil dapat disimpulkan bahwa ketiga senyawa aktif biji kacang merah memiliki potensi tinggi sebagai anti-alzheimer dengan cara berikatan dengan protein target beta sekretase, sehingga produksi beta amiloid dapat dihambat dan mencegah akumulasi menjadi plak amiloid.

Prediksi Sifat Fisikokimia Senyawa Aktif Kacang Merah

Sifat fisikokimia senyawa adalah sifat berdasarkan massa molekul, kelarutan dan kestabilan suatu senyawa. Sifat fisikokimia dapat dinilai menggunakan aturan lipinski, suatu senyawa dikatakan memenuhi aturan lipinski jika terdapat dua dari empat syarat diantaranya nilai berat molekul (BM) < 500 Da, nilai Log P < 5, *hydrogen bond donor* (HBD) < 5, dan *hydrogen bond acceptor* (HBA) < 10⁽¹⁴⁾.

Massa molekul yang kecil memudahkan senyawa untuk diabsorbsi, sedangkan nilai Log P menentukan kepolaran dari suatu senyawa, dimana Log P yang lebih besar dari 5 memiliki sifat non polar atau hidrofobik yang tidak larut dalam air, sehingga pada sirkulasi darah akan berada pada senyawa yang terikat protein dan akan tertahan lebih lama sehingga dapat bersifat toksik. Nilai P yang kurang dari 5 memiliki sifat polar dan larut dalam air, sehingga pada sirkulasi darah senyawa akan larut. Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen mendeskripsikan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi

energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi. Secara keseluruhan aturan lipinski adalah untuk mengetahui sifat kelarutan dan tingkat absorpsi senyawa aktif⁽¹⁵⁾.

Senyawa aktif biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) yang mempunyai kemampuan menghambat Alzheimer berdasarkan hasil penambatan molekul yaitu Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, dan Biochanin A, semuanya memenuhi aturan lipinski, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa keempat senyawa tersebut mudah diabsorbsi di intestinal dan larut dalam sirkulasi darah dalam bentuk bebas. Tingginya kadar senyawa aktif di dalam darah dapat meningkatkan ikatan antara senyawa aktif dan protein target sehingga lebih efektif dalam mencegah alzheimer⁽¹⁵⁾.

Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa Aktif Kacang Merah

Sifat farmakokinetik senyawa adalah sifat perjalanan suatu senyawa dari awal diabsorbsi sampai di ekskresi. Berdasarkan hasil prediksi sifat farmakokinetik dari senyawa aktif biji kacang merah, didapatkan hasil profil absorpsi dengan parameter absorpsi intestinal senyawa aktif kacang merah rata-rata diatas 90%, parameter permeabilitas Caco2 rata-rata diatas 0,9. Untuk bisa dikatakan suatu senyawa diserap baik oleh intestinal, parameter absorpsi intestinal harus diatas 30% dan parameter permeabilitas Caco2 harus diatas 0,9. Dapat disimpulkan senyawa aktif biji kacang merah memiliki daya absorpsi di intestinal yang tinggi serta dapat melewati seleksi dari Caco2 sel monolayer. Dengan demikian senyawa aktif akan berada di sirkulasi darah dengan konsentrasi yang cukup^(14,23).

Berdasarkan profil distribusi dilihat dari parameter *volume distribution steady state* (VDss) yaitu konsentrasi senyawa aktif pada sirkulasi darah yang dipertahankan dalam rentang waktu tertentu. VDss dikatakan tinggi jika nilai $\text{Log Vdss} > 0,45$ dan jika $\text{Log Vdss} < -0,15$ dikatakan rendah. Hasil menunjukkan rata-rata senyawa aktif memiliki $\text{log VDss} > 0,1$, senyawa aktif dengan nilai tertinggi > 0,9 yaitu cyanidin dan delphinadin. Adapun parameter yang diujikan adalah *Blood Brain Barrier* (BBB) yaitu konsentrasi yang diperkirakan dapat menembus sawar otak. Dikatakan dapat menembus sawar otak jika $\text{logBB} > 0,3$ dan tidak dapat menembus bila

logBB < -1, Hasil menunjukkan rata-rata senyawa aktif memiliki logBB > -1, senyawa paling tidak berpotensi menembus sawar otak adalah cyanidin dan delphinadin dengan nilai > -1,2, berdasarkan profil distribusi untuk senyawa aktif memiliki konsentrasi dalam sirkulasi darah yang stabil untuk menimbulkan efek fisiologis dan berpotensi rendah memberikan efek samping pada otak terutama senyawa delphinidin dan cyanidin^(11,23).

Selanjutnya profil metabolisme dilihat dari parameter CYP2D6 dan CYP3A4 inhibitor, jika ditemukan inhibitor enzim P450 maka proses oksidasi pada hepar tidak terjadi, senyawa aktif tidak akan di inaktivasi dan akan terus aktif, sehingga akan berakibat toksik. Data yang dihasilkan pada penelitian semua senyawa aktif kacang merah tidak ditemukan CYP2D6 dan CYP3A4 inhibitor, sehingga proses inaktivasi senyawa aktif di hepar akan berlangsung. Dapat disimpulkan semua senyawa aktif kacang merah dapat di metabolisme baik di hepar dan tidak dapat mengakibatkan hepatotoksik^(11,23).

Selanjutnya profil ekskresi, parameter yang digunakan adalah *Total Clearance* (CLTOT), semakin besar nilai maka semakin cepat proses *clearance* dari semua senyawa yang didistribusikan, CLTOT dari senyawa aktif memiliki rentang nilai antara -0,10 sampai -0,87, hasil penelitian menunjukkan semua senyawa aktif memiliki rata-rata CLTOT sebesar 0,2 dengan nilai tertinggi beta sitosterol dengan nilai 0,6. Dapat disimpulkan senyawa aktif kacang merah memiliki CLTOT yang sangat baik dan dapat diekresikan dengan normal, sehingga tidak mengakibatkan akumulasi dan bersifat toksik⁽²³⁾.

Hasil toksisitas yang dilakukan didapatkan bahwa semua senyawa aktif biji kacang merah tidak berpotensi mengakibatkan hepatotoksik dan aman untuk dikonsumsi⁽²³⁾.

Dari uraian diatas dapat disimpulkan secara farmakokinetik senyawa aktif biji kacang merah Cyanidin, Delphinadin, Beta-Sitosterol, Biochanin A, diprediksi mempunyai bioavailabilitas yang baik bila diberikan secara peroral dan tidak bersifat toksik⁽²³⁾.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan analisa data yang didapatkan dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Senyawa aktif biji kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) yaitu Beta-Sitosterol, Delphinadin, Biochanin A, Glisitein mempunyai afinitas tinggi terhadap alfa sekretase yang dibandingkan kontrol atorvastatin. Senyawa Cyanidin, Formonetin, Genistein dan Daidzein kurang berpotensi berikatan dengan alfa sekretase.
2. Senyawa aktif kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) yaitu Beta-Sitosterol, Delphinadin, Cyanidin, Biochanin A mempunyai afinitas tinggi terhadap beta sekretase. Senyawa Genistein, Formonetin, Daidzein, Glisitein kurang berpotensi berikatan dengan beta sekretase.
3. Beta-sitosterol, Biochanin A, Delphinadin, Cyanidin, Genistein, Glisitein, Daidzein dan Formononetin mempunyai sifat larut dalam air dan mudah diserap di intestinal. Sehingga secara keseluruhan senyawa aktif kacang merah memiliki bioavailabilitas yang baik jika dikonsumsi secara oral.
4. Beta-sitosterol, Biochanin A, Genistein, Glisitein, Daidzein dan Formononetin memiliki nilai ADME dan toksisitas baik sedangkan untuk Delphinadin dan Cyanidin kurang dalam menembus barrier Caco2. Namun secara keseluruhan senyawa aktif kacang merah memiliki sifat farmakokinetik dan toksisitas yang baik dan baik jika dikonsumsi secara oral.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* potensi senyawa aktif kacang merah sebagai anti-alzheimer dengan mekanisme mengaktivasi alfa sekretase dan menghambat beta sekretase dengan melihat biomarker Alzheimer pada hewan coba yang diinjeksikan amiloid beta.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada dosen pembimbing dan semua teman saya atas dukungan dan arahnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Duke D. Dr . Duke ' s Phytochemical and Ethnobotanical Databases Chemicals found in *Chimaphila mbelata*. 2011;1-4.
2. Guo F, Zhang Q, Yin Y, Liu Y, Jiang H, Yan N, et al. Legume consumption and risk of hypertension in a prospective cohort of

- Chinese men and women. **British Journal of Nutrition**. 2020;123(5):564–73.
3. Nuryanti R. Pengaruh Pemberian Puding Kacang Merah terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa, Hipertensi dan Non-Hipertensi pada Remaja. 2014;1–38.
 4. Hirohata M, Ono K, Takasaki J ichi, Takahashi R, Ikeda T, Morinaga A, et al. Anti-amyloidogenic effects of soybean isoflavones in vitro: Fluorescence spectroscopy demonstrating direct binding to A β monomers, oligomers and fibrils. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease**. 2012;1822(8):1316–24.2012.05.006
 5. Uddin MS, Kabir MT. Emerging signal regulating potential of genistein against Alzheimer's disease: A promising molecule of interest. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. 2019;1–12.
 6. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;41–54.
 7. Muliani. Tinjauan Literatur: Penyakit Alzheimer. Bali: **Fakultas kedokteran Udayana**; 2019. 30.
 8. Wedret JJ, Pharmacist S, Clinical A. Managing Alzheimer's Disease. 2021;1–14.
 9. Joshi A, Upadhyay H, Parekh K. Drug prescription patterns in patients with Alzheimer ' s disease in an urban. **Neuro speciality clinic in Western India**. 2019.
 10. Hardjono S. Sintesis Dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksi)Urea Dan 1-(4-Klorobenzoiloksi)Urea. **Berkala Ilmiah Kimia Farmasi**. 2013;2(1):16–21.
 11. Ekowati J, Diyah NW, Nofianti KA, Hamid IS, Siswandono. Molecular docking of ferulic acid derivatives on P2Y12 receptor and their ADMET prediction. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*. 2018;50(2):203–19.
 12. Damayanti DS. Potency of *Phaseolus vulgaris* a gainst ER α through in silico. **studies Jurnal Kesehatan Islam**. 2020;9(2):49–54.
 13. Dahlan S. Statistik-Untuk-Kedokteran-Dan-Kesehatan-Msopiyudin-Dahlan. 2011.
 14. Prayoga pannindriya. Analisis in silico kandungan senyawa kimia tumbuhan sambiloto (andrographis paniculata) terhadap reseptor histamin h2 sebagai anti tukak lambung. 2021.
 15. Husna. Studi in silico aktivitas penghambatan senyawa turunan kuersetin terhadap protease hiv-1 study in silico of quercetin derivatives inhibition activity towards hiv-1 protease. 2020.
 16. Parvathy S, Ehrlich M, Pedrini S, Diaz N, Refolo L, Buxbaum JD, et al. Atorvastatin-induced activation of Alzheimer's α secretase is resistant to standard inhibitors of protein phosphorylation-regulated ectodomain shedding. **Journal of Neurochemistry**. 2004;90(4):1005–10.
 17. Pedrini S, Carter TL, Prendergast G, Petanceska S, Ehrlich ME, Gandy S. Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. **PLoS Medicine**. 2005;2(1):0069–78.
 18. Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**. 2017;15(1):1–8.
 19. Jannah h, made sudarma i, andayani dy. Analisis senyawa fitosterol dalam ekstrak kacang merah (*phaseolus vulgaris* l.). Vol. 6, chem. Prog. 2013.
 20. Sudarlin S. Theoretical Modification of Cyanidin as Sensitizers in Dye Sensitized Solar Cell (DSSC) Using Rhodanine Acetic Acid as Electron Withdrawing Group. *JKPK (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia)*. 2019 Apr 30;4(1):34.
 21. Marselinus. turunan biochanin a sebagai ligan reseptor estrogen alfa. **Universitas Sanata Dharma Yogyakarta**.2016;1-41
 22. Timmers M, van Broeck B, Ramael S, Slemmon J, de Waepenaert K, Russu A, et al. Profiling the dynamics of CSF and plasma A β reduction after treatment with JNJ-54861911, a potent oral BACE inhibitor. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*.2016;2(3):202–12.
 23. Adinda A. Uji *In Silico* Sifat Fisikokimia dan Profil Farmakokinetik (ADMET) Senyawa Asam Betulinat Sebagai Kandidat Obat HIV.**Universitas Airlangga**.2020;1-12

