

Simulasi *Molecular Docking* Senyawa Coumestrol dengan Protein Kapsid Virus Hepatitis B: Studi *In Silico* Potensi Senyawa Alami

Molecular Docking Simulation of Coumestrol with Hepatitis B Virus Capsid Protein: An *In Silico* Study of the Potential of Natural Compounds

Muhammad Khalil

Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Samudra, Jl. Prof. Dr. Syarif Thayeb, Kota Langsa, 24416, Indonesia

corresponding author: muhammadkhalil@unsam.ac.id

ABSTRAK

Coumestrol adalah senyawa metabolit sekunder kelompok flavonoid yang ditemukan dalam berbagai tanaman seperti kedelai, kacang-kacangan, brokoli, dan bunga-bunga. Senyawa tersebut memiliki bioaktivitas sebagai anti inflamasi, antioksidan, serta aktivitas estrogenik yang dapat membantu mengurangi risiko kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mensimulasikan interaksi coumestrol dengan target protein kapsid virus hepatitis B (HBV) dengan pendekatan *in silico*. Penelitian menggunakan metode deskriptif eksploratif melalui analisis *molecular docking* dengan teknik *blind docking*. Struktur 2D dan 3D dari coumestrol dikoleksi dari database senyawa PubChem, sedangkan struktur 3D protein kapsid virus hepatitis B dikoleksi dari database protein PDB. Analisis docking menggunakan AutoDock Vina yang terintegrasi dengan PyRx. Hasil analisis menunjukkan bahwa binding affinity yang terbentuk dari kompleks coumestrol dan kapsid HBV berkisar antara -6.5 sampai -7 kkal/mol. Energi ini lebih rendah dari *binding affinity* protein target dengan ligan referensi yang berkisar -6.1 sampai -6.6 kkal/mol. Perbandingan visualisasi interaksi hasil docking membentuk *binding site* yang sama pada 9 residu asam amino, yaitu PHE 23, LEU 37, TRP 102, ILE 105, SER 106, THR 109, PHE 110, TYR 118, dan LEU 140. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa coumestrol memiliki bioaktivitas yang sama dengan ligan referensi, sehingga dapat digunakan sebagai senyawa *marker* yang berpotensi dikembangkan sebagai penghambat replikasi HBV.

Kata Kunci: *blind docking*; coumestrol; senyawa alami; studi *in silico*; virus hepatitis B.

ABSTRACT

Coumestrol is a secondary metabolite compound of the flavonoid group which is found in various plants such as soybeans, beans, broccoli, and flowers. These compounds have bioactivity as anti-inflammatory, antioxidant, and estrogenic activity which can help reduce the risk of breast cancer. This study aims to simulate the interaction of coumestrol with the hepatitis B virus (HBV) capsid protein target using an *in silico* approach. This research uses exploratory descriptive method through molecular docking analysis with blind docking technique. The 2D and 3D structures of coumestrol were collected from the PubChem database, while the 3D structures of the hepatitis B virus capsid protein were collected from the PDB protein database. Docking analysis using AutoDock Vina integrated with PyRx. The results of the analysis showed that the binding affinity formed from the coumestrol complex and the HBV capsid ranged from -6.5 to -7 kcal/mol. This energy is lower than the binding affinity of the target protein with the reference ligand which ranges from -6.1 to -6.6 kcal/mol. Comparison of visualization of the interactions resulting from docking formed the same binding sites on 9 amino acid residues, namely PHE 23, LEU 37, TRP 102, ILE 105, SER 106, THR 109, PHE 110, TYR 118, and LEU 140. Based on these results, it can be concluded that coumestrol has the same bioactivity as the reference ligand, so it can be used as a marker compound that has the potential to be developed as an inhibitor of HBV replication.

Keywords: Blind docking; coumestrol; hepatitis B virus; *in silico* study; natural compound.

*Manuskrip disubmisi pada 03-05-2023;
disetujui pada 30-05-2023.*

PENDAHULUAN

Hepatitis B adalah salah satu jenis hepatitis yang disebabkan oleh infeksi virus hepatitis B (HBV) (Yuen et al., 2018; Seeger & Mason, 2015). Virus ini menyerang hati dan dapat menyebabkan kerusakan parah pada organ tersebut. HBV menyebar melalui darah, cairan tubuh yang terkontaminasi, atau kontak seksual dengan seseorang yang terinfeksi. Berdasarkan data dari Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), terdapat sekitar 257 juta orang di seluruh dunia yang hidup dengan infeksi HBV kronis pada tahun 2019 (Liu et al., 2019). Infeksi ini merupakan penyebab utama terjadinya kanker hati, sirosis, dan kematian di seluruh dunia. Di Indonesia, virus hepatitis B juga menjadi masalah kesehatan yang signifikan. Berdasarkan data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, pada tahun 2018, prevalensi hepatitis B mencapai 3.3% atau sekitar 8.9 juta orang (Kemenkes RI, 2021). Meskipun menurun dibandingkan tahun sebelumnya, namun jumlah penderita hepatitis B di Indonesia masih sangat tinggi.

HBV memiliki struktur yang kompleks. Strukturnya mencakup protein permukaan (*surface antigen* atau HBsAg), yang berfungsi untuk melindungi virus dari respons kekebalan tubuh. Inti HBV mengandung DNA virus (genom), yang berperan dalam replikasi virus (Iannacone & Guidotti, 2022; Nooraei et al., 2021). Inti juga mengandung antigen inti (*core antigen* atau HBcAg), yang penting dalam diagnosis dan pengobatan infeksi virus hepatitis B. Virus HBV memiliki enzim DNA polimerase, yang berperan dalam sintesis DNA virus selama replikasi. Selain itu, HBV mengandung beberapa jenis protein, termasuk protein permukaan (HBsAg), protein inti (HBcAg), dan protein lainnya yang berperan dalam replikasi virus dan interaksi dengan sel inang (Zhao et al, 2021; Mak et al., 2017).

Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA) telah menyetujui beberapa jenis obat untuk digunakan dalam pengobatan infeksi HBV. Obat yang disetujui tersebut misalnya adalah interferon-alfa yang digunakan pada pasien yang tidak merespon terhadap terapi dengan obat antivirus. Selain itu, juga terdapat obat antivirus seperti lamiduvine, entecavir, tenofovir, dan adefovir. Namun, penggunaan obat ini dalam jangka panjang dapat menyebabkan resistensi dan mutasi spesifik pada HBV sehingga efikasi obat menurun (Khalil et al., 2020a; Firdayani et al., 2017). Menghadapi permasalahan tersebut, studi terkait pengobatan HBV dengan mencari alternatif target dalam pengobatan virus ini terus dilakukan. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan menjadikan protein kapsid HBV sebagai target karena peranannya pada replikasi HBV (Chen et al., 2021; Liu et al., 2021).

Studi terdahulu menunjukkan bahwa interaksi antara 4-methyl heteroaryldihydropyrimidine (4-metil HAP) mampu menghambat replikasi HBV (Qiu et al.,

2016). Selain menggunakan senyawa sintetik, penggunaan senyawa alami merupakan salah satu alternatif yang dapat diimplementasikan dalam pengobatan HBV. Studi pemanfaatan senyawa dari ekstrak tumbuhan berkhasiat obat merupakan salah satu upaya saintifikasi tumbuhan yang perlu dilakukan.

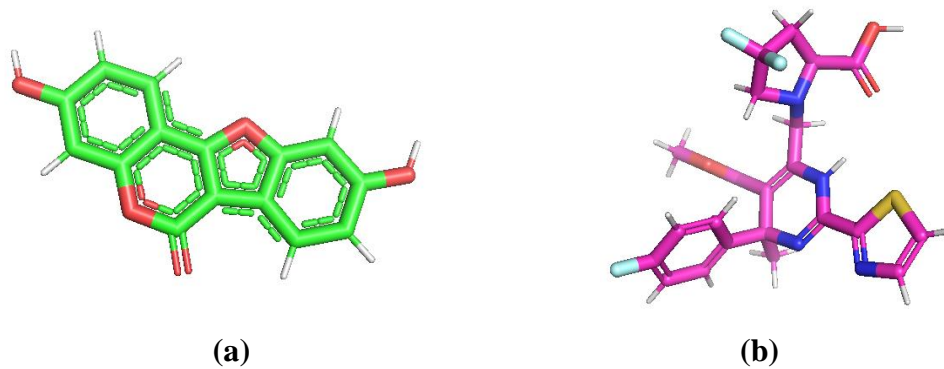
Coumestrol adalah salah satu senyawa fitokimia yang tergolong dalam kelompok flavonoid, tepatnya dalam sub-kelas isoflavonoid. Coumestrol memiliki rumus molekul $C_{15}H_8O_5$ dan memiliki berat molekul sebesar 268.22 g/mol (NCBI, 2023). Senyawa alami ini dapat ditemukan dalam berbagai jenis tumbuhan, seperti kedelai, kacang-kacangan, brokoli, dan bunga-bunga. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa konsumsi makanan yang mengandung coumestrol dapat memberikan manfaat kesehatan, seperti melindungi tubuh dari kanker, osteoporosis, penyakit jantung dan sebagai antivirus (Delshadi et al., 2021; Wu et al., 2020; Zafar et al., 2018).

Berdasarkan berbagai manfaat kesehatan yang dimiliki oleh senyawa coumestrol tersebut, peneliti melakukan studi yang bertujuan untuk menganalisis potensi senyawa coumestrol dalam menghambat replikasi HBV melalui pendekatan *in silico*.

METODE PENELITIAN

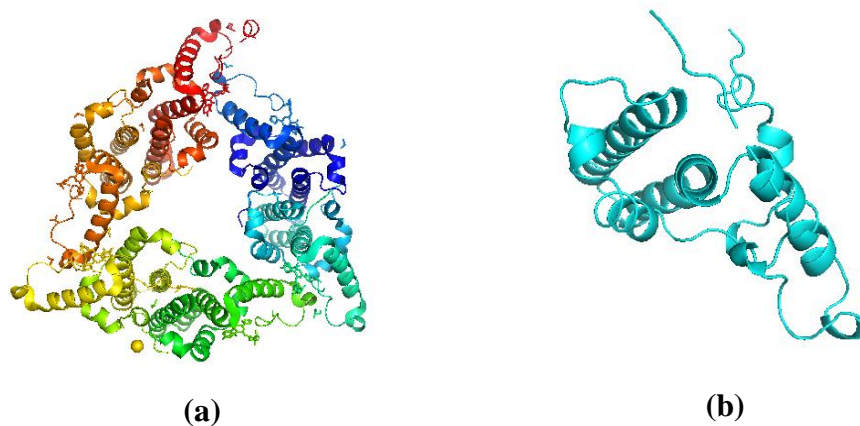
Penelitian menggunakan metode deskriptif eksploratif yang mengkaji potensi senyawa coumestrol dalam menghambat aktivitas replikasi virus hepatitis B (HBV) dengan pendekatan *in silico* menggunakan analisis *molecular docking* dengan teknik *blind docking*. Penelitian dilaksanakan pada Maret-Mei 2023 di laboratorium komputer Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Samudra. Studi *in silico* ini menggunakan struktur 3D dari senyawa coumestrol, ligan referensi, dan struktur protein kapsid HBV yang diperoleh dari database senyawa PubChem dan Protein Data Bank (PDB). Perangkat lunak yang digunakan dalam analisis ini diantaranya adalah PyMol, PyRx, dan Biovia Discovery Studio 2019. Tahapan dalam penelitian ini secara garis besar terdiri atas tahap koleksi struktur 3D dari senyawa, ligan referensi dan protein target; preparasi; analisis *molecular docking*; dan interpretasi.

Pada tahap koleksi, struktur 3D dari senyawa coumestrol diperoleh pada database PubChem dengan CID 5281707. Struktur 3D coumestrol diunduh dalam format *.sdf (Gambar 1a). selain itu, struktur ligan referensi juga di koleksi dari database yang sama. Ligan referensi yang digunakan adalah 4-methyl heteroaryldihydropyrimidine (4-metil HAP) (Qiu et al., 2016; Khalil et al., 2020b), dengan CID 121488107 (Gambar 1b).



Gambar 1. Struktur 3D (a) senyawa coumestrol; dan (b) ligan referensi

Protein target yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein inti dari kapsid HBV yang struktur 3Dnya di koleksi dalam format *.pdb dari database PDB dengan ID 5GMZ. Struktur 3D protein ini memiliki resolusi 1.70 Å dan merupakan kompleks yang terdiri atas 5 sekuens dengan panjang sekitar 155 asam amino (Gambar 2a). Protein kapsid HBV tersebut membentuk komplek dengan senyawa 4-metil HAP (ligan ID: 6XU). Ligan tersebut dijadikan sebagai referensi dalam analisis. Tahapan berikutnya dilakukan preparasi coumestrol dan 4-metil HAP dengan meminimalisir energi ligan sehingga ligan stabil (Hanif, 2022). Sedangkan pada protein target sebagai reseptor preparasi dilakukan dengan memilih sekuens 3D terlengkap dari kompleks protein kapsid (Gambar 2). Hasil preparasi ini selanjutnya digunakan sebagai bahan dalam analisis *molecular docking*.



Gambar 2. Struktur 3D (a) protein kapsid HBV; dan (b) rantai kapsid HBV telah dipreparasi

Tahapan analisis *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan AutoDock Vina yang terintegrasi dalam PyRx (Trott & Olson, 2010). Teknik *blind docking* digunakan dalam analisis untuk menemukan konformasi paling optimal pada seluruh bagian sekuens protein target (Stanzione et al., 2021). Hasil analisis selanjutnya diinterpretasikan berdasarkan membandingkan skor *binding affinity*, *binding site*, serta interaksi yang terbentek antara ligan

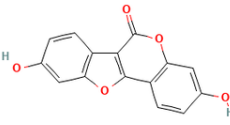
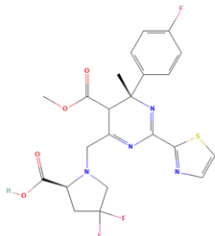
dan reseptor yang memmbentuk kompleks. Semakin kecil skor yang terbentuk mengindikasikan bahwa ikatan yang terbentuk semakin optimal (Pantsar & Poso, 2018). *Binding site* dan interaksi ligan-reseptor hasil analisis di visualisasikan dengan PyMol dan Biovia Discovery Studio 2019. Perbandingan *binding site* dan interaksi yang terbentuk antara coumestrol dan 4-metil HAP terhadap protein kapsid virus digunakan untuk memprediksi bioaktivitas coumestrol dalam menghambat replikasi HBV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Informasi terkait ligan referensi dan senyawa coumestrol yang digunakan dalam kajian ini beserta struktur 2Dnya disajikan pada Tabel 1. Pada tabel terdapat informasi PubChem ID, rumus kimia, berat molekul, donor ikatan hidrogen (HbD), aseptor ikatan hidrogen (HbA), jumlah ikatan rotasional (nRB), koefisien partisi (LogP), dan juga struktur 2D (NCBI, 2023).

Tabel 1. Informasi struktur ligan

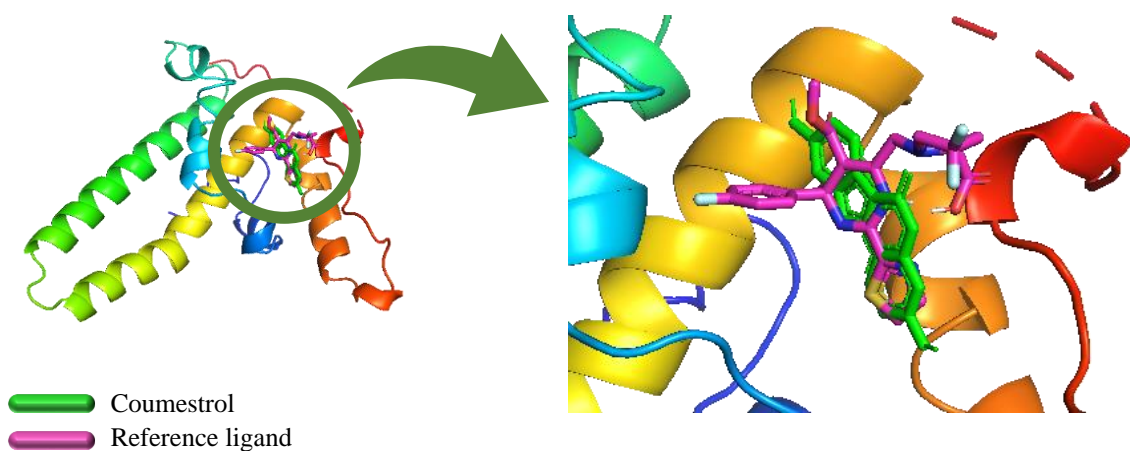
Nama Senyawa	PubChem ID	Rumus Kimia	Berat Molekul (g/mol)	HbD	HbA	nRB	LogP	Struktur 2D
Coumestrol	5281707	C ₁₅ H ₈ O ₅	268.22	2	5	0	2.8	
4-methyl HAP (Ligan referensi)	7121488107	C ₂₂ H ₂₁ F ₃ N ₄ O ₄ S	494.5	1	11	7	0.9	

Analisis *molecular docking* yang dilakukan dalam studi ini menggunakan teknik *blind docking* untuk menemukan lokasi penambatan ligan yang paling optimal diseluruh bagian protein target dengan algoritma program AutoDock Vina (Sharmar et al., 2018; Khalil et al., 2023). Hasil *docking* antara ligan referensi dan protein kapsid HBV menunjukkan model simulasi dengan skor *binding affinity* berkisar antara -6.1 sampai -6.6 kkal/mol. Sedangkan model yang berhasil disimulasikan dari *docking* antara senyawa coumestrol dengan protein kapsid HBV memiliki skor *binding affinity* antara -6.5 sampai dengan -7 kkal/mol (Tabel 2).

Tabel 2. Skor *binding affinity* antara ligan dan reseptor

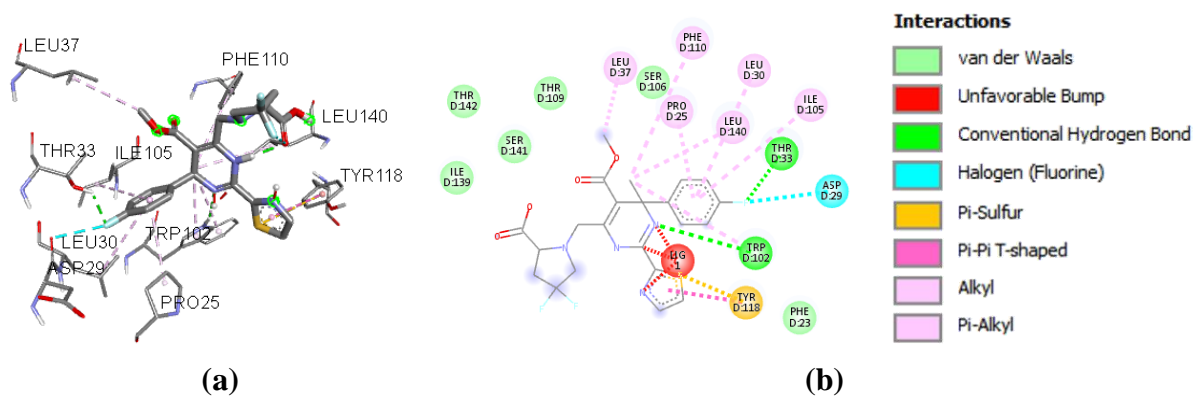
Ligand	Mode	<i>Binding Affinity</i> (kkal/mol)	RMSD/UB (Å)	RMSD/LB (Å)
5gmz—reference ligand	0	-6.6	0	0
	1	-6.4	19.077	16.533
	2	-6.3	6.356	4.018
	3	-6.3	17.285	15.271
	4	-6.2	8.656	4.978
	5	-6.2	24.459	21.038
	6	-6.1	7.459	3.327
	7	-6.1	19.942	17.184
	8	-6.1	19.417	16.925
5gmz—coumestrol	0	-7	0	0
	1	-6.8	6.176	1.298
	2	-6.8	2.21	2.041
	3	-6.8	3.177	1.631
	4	-6.7	8.729	3.841
	5	-6.7	18.483	17.127
	6	-6.7	6.103	4.077
	7	-6.5	4.444	2.822
	8	-6.5	6.497	2.28

Struktur 3D dari interaksi yang terbentuk antara coumestrol, ligan referensi, dan protein kapsid HBV di visualisasikan dengan PyMol. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa coumestrol dan ligan referensi membentuk kompleks dengan protein kapsid HBV pada *binding site* yang relatif sama (Gambar 3).



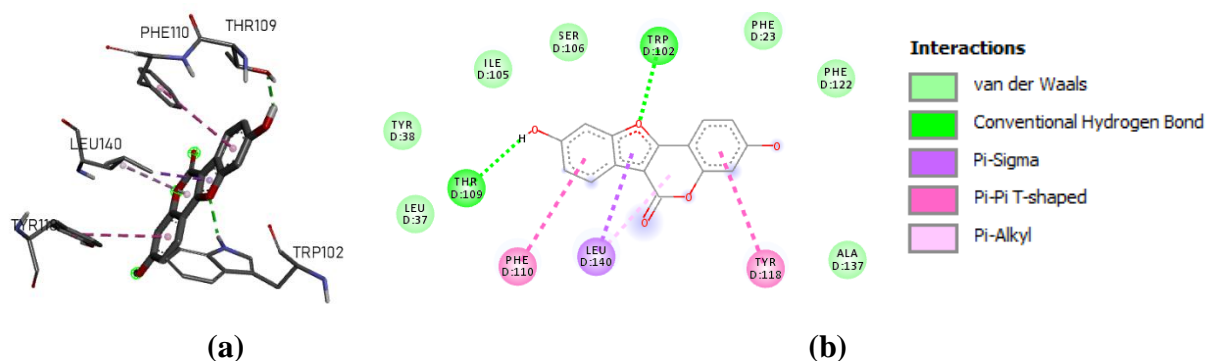
Gambar 3. Visualisasi *binding site* antara coumestrol, ligan referensi, dan protein kapsid HBV

Visualisasi interaksi pada kompleks yang terbentuk dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan *software* Biovia Discovery Studio 2019. Kompleks antara ligan referensi dan protein kapsid HBV hasil *docking* melibatkan 17 residu asam amino dengan berbagai jenis ikatan. Interaksi tersebut meliputi interaksi van der Waals pada residu asam amino PHE 23, SER 106, THR 109, ILE 139, SER 141, dan THR 142, conventional hydrogen bond pada residu asam amino THR 33 dan TRP 102, interaksi halogen (fluorine) pada ASP 29, interaksi pi-sulfur dan pi-pi T-shaped pada TYR 118, serta interaksi alkyl dan pi-alkyl melibatkan asam amino PRO 25, LEU 30, LEU 37, TRP 102, ILE 105, PHE 110, dan LEU 140 (Gambar 4).



Gambar 4. Visualisasi interaksi ligan referensi (a) struktur 3D; dan (b) struktur 2D

Pada interaksi antara coumestrol dengan protein kapsid HBV yang terbentuk dari hasil *docking* terdapat total 12 residu asam amino yang membentuk interaksi, yaitu interaksi van der Waals pada residu asam amino PHE 23, LEU 37, TYR 38 ILE 105, SER 106, PHE 122, dan ALA 137. kemudian interaksi conventional hydrogen bond pada TRP 102 dan THR 109. Interaksi Pi-Sigma dan Pi-Alkyl pada residu asam amino LEU 140, serta interaksi Pi-Pi T-shaped pada PHE 110 dan TYR 118 (Gambar 5).



Gambar 5. Visualisasi interaksi senyawa coumestrol (a) struktur 3D; dan (b) struktur 2D

Pembahasan

Pengobatan dengan tanaman herbal merupakan upaya alternatif yang saat ini populer dalam menyembuhkan berbagai macam gangguan kesehatan. Penggunaan tanaman herbal telah diturunkan dari generasi ke generasi tentang cara pemilihan, penyiapan, dan penggunaan komposisi herbal untuk mengendalikan dan mengobati berbagai macam penyakit. Tumbuhan herbal telah digunakan untuk mengobati penyakit endokrin dan metabolik, penyakit imunologi dan neurologis, bahkan infeksi dari bakteri dan virus (Alamgir, 2018). Tanaman herbal memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang secara alami dihasilkan. Kajian potensi dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman terus dilakukan untuk menguji potensi yang dimiliki senyawa-senyawa tersebut khususnya berkaitan dengan gangguan kesehatan.

Berdasarkan hasil kajian *docking* yang dilakukan dalam studi potensi senyawa metabolit sekunder ini, coumestrol mampu membentuk ikatan dengan protein kapsid HBV pada *binding site* yang relatif jika dibandingkan dengan *binding site* yang dibentuk dari hasil *redocking* ligan referensi yang digunakan. Perbandingan skor *binding affinity* juga menunjukkan bahwa dari semua hasil simulasi *molecular docking* coumestrol memiliki skor pengikatan yang lebih rendah dari ligan referensi. Pada pemodelan 0 diperoleh skor sebesar -7 kkal/mol pada coumestrol sedangkan 4-metil HAP pada pemodelan 0 hanya memiliki skor pengikatan -6.6 kkal/mol. Skor tersebut mengindikasikan sejumlah energi bebas Gibbs (ΔG) yang dibutuhkan dalam membentuk suatu ikatan. Semakin rendah skor yang dimiliki maka energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan juga semakin sedikit dan efisien (Shen et al., 2020; Bitencourt-Ferreira et al., 2019).

Visualisasi hasil *blind docking* antara ligan referensi dan coumestrol terhadap protein kapsid HBV menunjukkan bahwa *binding site* pada kedua kompleks hasil *docking* berada pada lokasi yang sama. Visualisasi lebih lanjut yang dilakukan memberikan informasi bahwa terdapat 17 residu asam amino yang berinteraksi dalam kompleks 4-metil HAP sebagai ligan referensi dengan protein kapsid HBV. Interaksi tersebut meliputi interaksi van der Waals, conventional hydrogen bond, halogen (fluorine), pi-sulfur, pi-pi T-shaped, alkyl, dan pi-alkyl. Sedangkan pada kompleks coumestrol dengan protein target melibatkan 12 residu asam amino yang membentuk interaksi van der Waals, conventional hydrogen bond, pi-Sigma, pi-alkyl, dan pi-pi T-shaped. Perbandingan antara interaksi pada kedua kompleks hasil *docking* tersebut memiliki kesamaan pada 9 residu asam amino, yaitu PHE 23, LEU 37, TRP 102, ILE 105, SER 106, THR 109, PHE 110, TYR 118, dan LEU 140.

Coumestrol berdasarkan indikator perbandingan skor *binding affinity*, *binding site*, dan interaksi dalam studi *in silico* ini diprediksikan memiliki potensi bioaktivitas yang sama dengan ligan referensi 4-metil HAP dalam menghambat replikasi HBV dengan berikatan pada protein kapsid virus. Sehingga keberadaan coumestrol pada tanaman tertentu dapat dijadikan sebagai senyawa *marker* bahwa tanaman tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan dalam pengobatan infeksi HBV.

KESIMPULAN

Coumestrol dapat digunakan sebagai senyawa *marker* yang memiliki potensi bioaktivitas dalam menghambat replikasi virus hepatitis B dengan berikatan pada protein kapsid virus. Skor *binding affinity* kompleks coumestrol dengan protein kapsid virus lebih rendah dari kompleks ligan referensi ($-7 < 6.6$ kkal/mol), serta perbandingan berdasarkan *binding site* yang terbentuk menunjukkan lokasi pengikatan yang relatif sama dengan interaksi melibatkan 9 residu asam amino yang sama, terdiri dari PHE 23, LEU 37, TRP 102, ILE 105, SER 106, THR 109, PHE 110, TYR 118, dan LEU 140.

UCAPAN TERIMA KASIH

Author menyampaikan terima kasih kepada Labotorium Herbal UPT Materia Medica Batu, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, yang telah menyediakan data awal dan sampel tanaman herbal yang kami analisis kandungan senyawa dan bioaktivitasnya dalam penelitian ini. Terima kasih juga author sampaikan kepada Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Samudra yang telah memfasilitasi kami selama penelitian berlangsung.

REFERENSI

- Alamgir, A. N. M. (2018). Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (treatment and prevention). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds*, 585-664. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7.
- Bitencourt-Ferreira, G., Pinto, V. O., & Azevedo, W. F. D. (2019). Docking with autodock4. In *Docking Screens for Drug Discovery* (pp. 125-148). Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_9.
- Chen, L., Liu, W. G., Xiong, F., Ma, C., Sun, C., Zhu, Y. R., & Wang, Z. H. (2021). 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulations analyses of a series of heteroaryldihydropyrimidine derivatives as hepatitis B virus capsid assembly inhibitors. *New Journal of Chemistry*, 45(47), 22062-22076. <https://doi.org/10.1039/D1NJ02542B>.

- Delshadi, R., Bahrami, A., McClements, D. J., Moore, M. D., & Williams, L. (2021). Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. *Journal of Controlled Release*, 331, 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.017>.
- Firdayani, Kusumaningrum, S., & Miranti, Y. R. (2017). Potensi Senyawa Bioaktif Tanaman Genus *Phyllanthus* Sebagai Inhibitor Replikasi Virus Hepatitis B. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 4(2), 85-95. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v4i2.2589>.
- Hanif, A. U., Lukis, P. A., & Fadlan, A. (2020). Pengaruh minimisasi energi MMFF94 dengan MarvinSketch dan open Babel PyRx pada penambatan molekular turunan oksindola tersubstitusi. *Alchemy*, 8(2), 33-40. <https://doi.org/10.18860/al.v8i2.10481>.
- Iannacone, M., & Guidotti, L. G. (2022). Immunobiology and pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 22(1), 19-32. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00549-4>.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2021). *Panduan Peringatan Hari Hepatitis Sedunia XII 28 Juli 2021*.
- Khalil, M., Rosadha, R. S., Saputra, A. R., Akbar, M. N., Azmi, U., & Hapsari W. K. (2020a). Potensi Senyawa Bioaktif B-Carotene Sebagai Kandidat Antivirus Hepatitis B. *Jurnal Geuthèè: Penelitian Multidisiplin*, 3(1), 393-399. <https://doi.org/10.52626/jg.v3i1.73>.
- Khalil, M., Akbar, M. N., Saputra, A. R., & Kusuma, S. H. (2023). Naringin's potential as a hepatitis B virus replication inhibitor: an in silico study of secondary metabolite compound. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 9(2), 104-113. <https://doi.org/10.31603/pharmacy.v9i2.8564>.
- Khalil, M., Amin, M., & Lukiati, B. (2020b). Analisis potensi senyawa repensol sebagai kandidat inhibitor replikasi virus hepatitis B secara in silico. *In Prosiding Seminar Nasional Biotik*, 8(1), 358-363. <http://dx.doi.org/10.22373/pbio.v8i2.9669>.
- Liu, H., Xi, J., & Hu, J. (2021). Regulation of hepatitis B virus replication by cyclin docking motifs in core protein. *Journal of Virology*, 95(12), e00230-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00230-21>.
- Liu, J., Liang, W., Jing, W., & Liu, M. (2019). Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(3), 230. <https://doi.org/10.2471%2FBLT.18.219469>.
- Mak, L. Y., Wong, D. K. H., Seto, W. K., Lai, C. L., & Yuen, M. F. (2017). Hepatitis B core protein as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(12), 1153-1159. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397134>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5281707, Coumestrol. Retrieved April 28, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coumestrol>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 71739468. Retrieved April 28, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71739468>.
- Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 1-27. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>.
- Pantsar, T., & Poso, A. (2018). Binding affinity via docking: fact and fiction. *Molecules*, 23(8), 1899. <https://doi.org/10.3390/molecules23081899>.
- Qiu, Z., Lin, X., Zhou, M., Liu, Y., Zhu, W., Chen, W., & Tang, G. (2016). Design and synthesis of orally bioavailable 4-methyl heteroaryldihydropyrimidine based hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 59(16), 7651-7666. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00879>.

- Seeger, C., & Mason, W. S. (2015). Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, *479*, 672-686. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>.
- Sharmar, S., Garg, I., Kumar, B., & Ashraf, M. Z. (2018). Comparative analysis of blind docking reproducibility. *Res J Life Sci Bioinfor Pharm Chem Sci*, *4*(3), 211-222. <https://doi.org/10.26479/2018.0403.18>.
- Shen, C., Ding, J., Wang, Z., Cao, D., Ding, X., & Hou, T. (2020). From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand docking. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *10*(1), e1429. <https://doi.org/10.1002/wcms.1429>.
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, *60*, 273-343. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, *31*(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Wu, Z. Z., Rao, M., Xu, S., Hu, H. Y., & Tang, Q. Z. (2020). Coumestrol ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AMPK α . *Free Radical Research*, *54*(8-9), 629-639. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1822525>.
- Yuen, M. F., Chen, D. S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L., Lau, D. T., Locarnini, S. A., Peters, M. G., & Lai, C. L. (2018). Hepatitis B virus infection. *Nature reviews Disease primers*, *4*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>.
- Zafar, A., Singh, S., Satija, Y. K., Saluja, D., & Naseem, I. (2018). Deciphering the molecular mechanism underlying anticancer activity of coumestrol in triple-negative breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*, *46*, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.007>.
- Zhao, F., Xie, X., Tan, X., Yu, H., Tian, M., Lv, H., ... & Zhu, Q. (2021). The functions of hepatitis B virus encoding proteins: viral persistence and liver pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, *12*, 691766. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691766>.