

Pendekatan Studi Komputasi terhadap Turunan Kafein sebagai Dual Inhibitor Enzim AChE dan BChE untuk Kandidat Terapi Alzheimer.

Novira Azzahra¹, Ruswanto^{2*}, Dichy Nuryadin Zain²

Program Studi Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: azzahranovira27@gmail.com

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by cognitive decline, primarily due to decreased levels of the neurotransmitter acetylcholine in the brain. This condition is closely associated with the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), enzymes responsible for acetylcholine degradation. Current Alzheimer's therapies remain limited, necessitating the search for new drug candidates, one of which involves the development of caffeine derivatives as AChE and BChE inhibitors.

Objective: This study aimed to evaluate the potential of caffeine-derived compounds as dual inhibitors of AChE and BChE as candidates for Alzheimer's disease therapy using an *in silico* approach.

Methods: The study was conducted *in silico* using molecular docking, drug-likeness evaluation based on Lipinski's rule of five, and prediction of pharmacokinetic and toxicity properties (ADMET). The target protein structures of AChE (PDB ID: 4EY7) and BChE (PDB ID: 1P0I) were first validated using Ramachandran plot analysis, Verify3D, and ERRAT to ensure protein structure quality prior to docking.

Results: Molecular docking results indicate that the compound (E)-8-(3-bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine exhibits the highest binding affinity for the AChE enzyme, with a ΔG value of -11.70 kcal/mol—surpassing both the natural ligand (-10.63 kcal/mol) and donepezil (-11.55 kcal/mol). This compound forms a hydrogen bond with TYR A:124 and engages in hydrophobic interactions with PHE A:335, TYR A:337, HIS A:447, and TRP A:256. Conversely, regarding the BChE target, donepezil demonstrates the best binding affinity ($\Delta G = -9.15$ kcal/mol), forming hydrophobic interactions with TRP A:231, LEU A:286, TRP A:82, and TYR A:126. Ligand–receptor interaction analysis reveals hydrogen bonding and hydrophobic interactions that facilitate the ligand's binding to the receptor's active site. Evaluations of drug-likeness and ADMET predictions indicate that the caffeine derivative possesses a pharmacokinetic and toxicity profile favorable for a drug candidate. **Conclusion:** Based on the *in silico* findings, caffeine-derived compounds show potential as Inhibitors of both AChE and BChE, and they hold promise for further development as candidates for Alzheimer's disease therapy.

Keywords: Alzheimer's, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Caffeine_Derivatives, Molecular_Docking

Abstrak

Pendahuluan: Alzheimer merupakan penyakit neurodegeneratif progresif yang ditandai dengan penurunan fungsi kognitif, terutama akibat menurunnya kadar neurotransmiter asetilkolin di otak. Kondisi ini berkaitan erat dengan aktivitas enzim asetilkolinesterase (AChE) dan butirilkolinesterase (BChE) yang berperan dalam degradasi asetilkolin. Terapi Alzheimer saat ini masih memiliki keterbatasan, sehingga diperlukan pencarian kandidat obat baru, salah satunya melalui pengembangan senyawa turunan kafein sebagai inhibitor AChE dan BChE. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk menilai potensi senyawa turunan kafein sebagai dual inhibitor AChE dan BChE sebagai kandidat terapi penyakit Alzheimer menggunakan pendekatan studi *in silico*. **Metode:** Penelitian dilakukan secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*, evaluasi *drug-likeness* berdasarkan aturan Lipinski, serta prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas (ADMET). Struktur protein target AChE (PDB ID: 4EY7) dan BChE (PDB ID: 1P0I) terlebih dahulu divalidasi menggunakan Ramachandran plot, Verify3D, dan ERRAT untuk memastikan kualitas struktur protein sebelum dilakukan proses *docking*. **Hasil:** Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa senyawa (E)-8-(3-bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine memiliki afinitas pengikatan tertinggi terhadap enzim AChE dengan nilai ΔG $-11,70$ kkal/mol, bahkan melampaui ligan alami ($-10,63$ kkal/mol) dan donepezil ($-11,55$ kkal/mol). Senyawa tersebut membentuk ikatan hidrogen dengan TYR A:124 serta interaksi hidrofobik dengan PHE A:335, TYR A:337, HIS A:447, dan TRP A:256. Sementara itu, pada target

BChE, donepezil masih menunjukkan afinitas pengikatan terbaik dengan nilai ΔG -9,15 kkal/mol dan membentuk interaksi hidrofobik dengan TRP A:231, LEU A:286, TRP A:82, dan TYR A:126. Analisis interaksi ligan–reseptor menunjukkan adanya ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang mendukung interaksi ligan dengan sisi aktif reseptor. Evaluasi *drug-likeness* dan prediksi ADMET menunjukkan bahwa senyawa turunan kafein memiliki profil farmakokinetik dan toksisitas yang mendukung sebagai kandidat obat. **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil penelitian *in silico*, senyawa turunan kafein berpotensi sebagai inhibitor awal AChE dan BChE memiliki prospek untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat terapi penyakit Alzheimer.

Kata kunci: *Alzheimer, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Turunan_Kafein, Molecular_Docking*

PENDAHULUAN

Alzheimer merupakan penyakit neurodegeneratif progresif dan penyebab utama demensia yang ditandai dengan penurunan fungsi kognitif dan memori. Jumlah penderita demensia terus meningkat secara global, dari sekitar 55 juta kasus pada tahun 2022 menjadi 139 juta kasus pada tahun 2050 (WHO, 2022). Di Indonesia, jumlah kasus diperkirakan meningkat dari 1,2 juta pada tahun 2016 menjadi 4 juta pada tahun 2050 (Kemenkes, 2016). Kondisi ini menunjukkan perlunya pengembangan terapi Alzheimer yang lebih efektif dan aman. Penurunan kadar asetilkolin akibat aktivitas enzim asetilkolinesterase (AChE) dan butirilkolinesterase (BChE) berperan penting dalam patogenesis Alzheimer, sehingga kedua enzim tersebut menjadi target terapi utama (Marucci et al., 2021). Meskipun inhibitor kolinesterase seperti donepezil, galantamin, dan rivastigmin telah digunakan secara klinis, efektivitasnya masih terbatas karena efek samping dan penurunan respons pada terapi jangka panjang (Peng et al., 2023). Kafein merupakan alkaloid golongan xantin yang memiliki aktivitas neuroprotektif, termasuk menurunkan akumulasi beta-amiloid dan memperbaiki fungsi kognitif (Bombeiro et al., 2020; Yelanchezian et al., 2022). Modifikasi struktur kafein dilaporkan dapat meningkatkan afinitas terhadap AChE dan BChE serta berpotensi menurunkan toksisitasnya (Dall'Igna et al., 2007; Ozten et al., 2021). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi turunan kafein sebagai inhibitor ganda AChE dan BChE melalui *molecular docking*, serta analisis *drug-likeness* dan ADMET untuk menilai kelayakannya sebagai kandidat terapi Alzheimer (Zouaghi et al., 2021).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa 50 senyawa turunan kafein yang diperoleh dari berbagai jurnal ilmiah dan diunduh dari database PubChem. Struktur protein target yang digunakan adalah Acetylcholinesterase (AChE) dengan kode PDB 4EY7 dan Butyrylcholinesterase (BChE) dengan kode PDB 1P0I, yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) melalui situs <http://www.rcsb.org/>.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop dengan spesifikasi prosesor AMD Ryzen 5, RAM 8 GB, dan sistem operasi Windows 11.

Perangkat lunak yang digunakan meliputi MarvinSketch, AutoDockTools 1.5.7, PyRx 0.9, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, dan Molegro Molecular View. Selain itu, digunakan beberapa situs web pendukung, yaitu Protein Data Bank (PDB), PubChem, PROCHECK (Ramachandran plot), SAVES (ERRAT), SwissADME (Lipinski Rule of Five), dan pkCSM.

Analisis Reseptor

Analisis reseptor dilakukan terhadap struktur protein AChE (4EY7) dan BChE (1P0I) menggunakan situs <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>. Parameter kualitas struktur protein dievaluasi menggunakan plot

Ramachandran, dengan kriteria residu pada *disallowed regions* kurang dari 0,8% (Ruswanto et al., 2023). Analisis lanjutan dilakukan menggunakan ERRAT melalui situs <https://saves.mbi.ucla.edu/> untuk memastikan kualitas struktur protein (Sanjaya et al., 2021). Reseptor yang memenuhi kriteria validasi digunakan pada tahap selanjutnya.

Preparasi Reseptor

Struktur protein AChE dan BChE diperoleh dari Protein Data Bank dalam format *.pdb*. Preparasi reseptor dilakukan dengan menghapus ligan asli, molekul air, dan ion menggunakan *Molegro Molecular Viewer*. Struktur kemudian ditambahkan atom hidrogen dan diperbaiki menggunakan *Discovery Studio Visualizer*, lalu diberi muatan *Gasteiger* serta disiapkan dalam format *.pdbqt* menggunakan *AutoDockTools 1.5.7*.

Preparasi Ligan

Senyawa turunan kafein diperoleh dari *PubChem* dan digambar menggunakan *MarvinSketch*. Ligan diprotonasi pada pH 7,4, dioptimasi geometri, dan dilakukan pencarian konformasi untuk memperoleh struktur paling stabil. Struktur kemudian dikonversi ke format *.pdbqt* menggunakan *AutoDockTools*.

Validasi Metode Docking

Validasi dilakukan melalui *redocking* ligan asli ke sisi aktif reseptor menggunakan parameter yang sama seperti *docking* ligan uji. Metode dinyatakan valid jika nilai RMSD < 2,0 Å.

Molecular Docking

Docking dilakukan menggunakan PyRx untuk mengevaluasi interaksi ligan dengan AChE dan BChE. Hasil dianalisis berdasarkan nilai *binding affinity*, di mana nilai yang lebih negatif menunjukkan interaksi yang lebih kuat.

Visualisasi dan Analisis Hasil Docking

Interaksi ligan reseptor dianalisis menggunakan *Discovery Studio Visualizer* untuk mengidentifikasi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Senyawa dengan energi ikatan terendah dipilih sebagai kandidat terbaik.

Analisis Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas (ADME-Toksisitas)

Senyawa terpilih dievaluasi berdasarkan *Lipinski's Rule of Five* menggunakan *SwissADME* untuk menilai potensi kelayakan sebagai obat oral. Sifat farmakokinetik dan toksisitas diprediksi menggunakan *pKCSM* berdasarkan representasi SMILES untuk mengevaluasi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADMET).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Reseptor

Analisis reseptor dilakukan terhadap enzim Acetylcholinesterase (AChE) dengan kode PDB 4EY7 dan Butyrylcholinesterase (BChE) dengan kode PDB 1P0I, yang berperan dalam mekanisme terapi penyakit Alzheimer. Struktur tiga dimensi masing-masing reseptor (Gambar 1.) diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) dalam format *.pdb*. Analisis kualitas struktur reseptor dilakukan menggunakan PROCHECK, Verify3D, dan ERRAT.



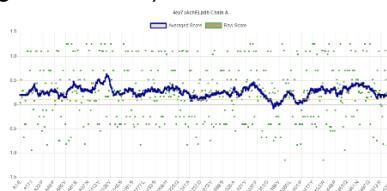
Gambar 1. Struktur (a) Reseptor AChE (4EY7) dan (b) Reseptor BChE (1P0I)

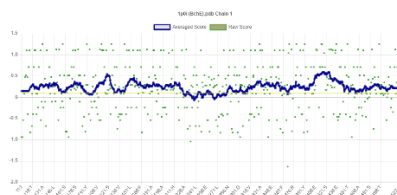
Evaluasi awal kualitas struktur protein dilakukan menggunakan **PROCHECK** melalui analisis **plot Ramachandran** (Gambar 2.), yang bertujuan untuk menilai kestabilan stereokimia struktur protein berdasarkan sudut torsi ϕ (phi) dan ψ (psi) (Laskowski et al., 1993). Kualitas struktur protein dinyatakan baik apabila residu asam amino pada *disallowed regions* kurang dari **0,8%** (Ruswanto et al., 2018).



Gambar 2. Plot Ramachandran (a) Reseptor AChE (4EY7) dan (b) Reseptor BChE (1P0I)

Hasil analisis plot Ramachandran menunjukkan bahwa residu asam amino reseptor **AChE** berada pada *most favoured regions* sebesar **90,8%**, sedangkan reseptor **BChE** sebesar **87,6%**. Pada *additional allowed regions*, AChE dan BChE masing-masing memiliki **9,0%** dan **11,7%** residu. Reseptor AChE tidak memiliki residu pada *generously allowed regions* (0,0%), sedangkan BChE memiliki **0,5%** residu. Pada *disallowed regions*, kedua reseptor menunjukkan nilai yang sama, yaitu **0,2%**. Berdasarkan hasil tersebut, struktur protein AChE dan BChE dinyatakan stabil dan layak digunakan untuk tahap analisis selanjutnya. Analisis kualitas struktur protein selanjutnya dilakukan menggunakan **Verify3D** melalui situs **SAVES** untuk mengevaluasi kesesuaian struktur tiga dimensi terhadap urutan asam amino satu dimensi. Suatu model protein dinyatakan memiliki kualitas baik apabila $\geq 80\%$ residu menunjukkan skor rata-rata **3D-1D $\geq 0,1$** (Eisenberg et al., 1997).

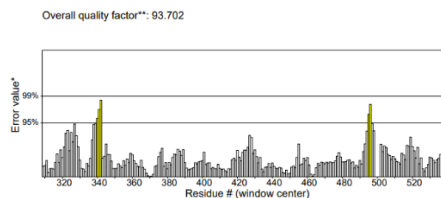




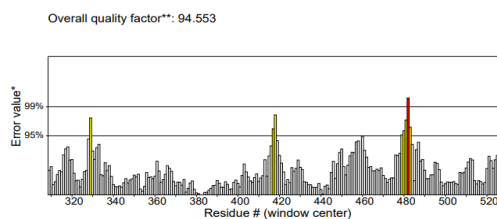
(b)

Gambar 3. Hasil Verify3D (a) Reseptor AChE (4EY7) dan (b) Reseptor BChE (1P0I)

Berdasarkan hasil analisis Verify3D, reseptor AChE menunjukkan **93,33%** residu dengan skor 3D–1D $\geq 0,1$, sedangkan reseptor BChE menunjukkan **88,34%** residu yang memenuhi kriteria tersebut. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua struktur reseptor memiliki kualitas model yang baik dan sesuai untuk digunakan dalam analisis *docking*. Evaluasi kualitas struktur protein juga dilakukan menggunakan **ERRAT**, yang menganalisis interaksi non-kovalen antar atom dalam struktur protein. Model protein dikategorikan baik apabila nilai *overall quality factor* berada mendekati atau di atas **95%** (Colovos & Yeates, 1993).



(a)



(b)

Gambar 4. Hasil ERRAT (a) Reseptor AChE (4EY7) dan (b) Reseptor BChE (1P0I)

Hasil analisis ERRAT menunjukkan bahwa reseptor **AChE** memiliki nilai *overall quality factor* sebesar **93,702%**, sedangkan reseptor **BChE** sebesar **94,553%**. Meskipun nilai tersebut sedikit berada di bawah nilai 95% yang umumnya digunakan sebagai acuan kualitas struktur protein, hasil tersebut masih menunjukkan kualitas struktur protein yang baik (Colovos & Yeates, 1993). Jika dikombinasikan dengan hasil analisis plot Ramachandran dan Verify3D, kedua reseptor dinyatakan **memiliki kualitas struktur yang memadai dan layak digunakan** dalam penelitian ini.

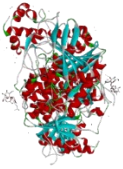
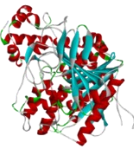
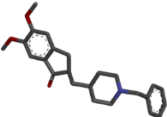
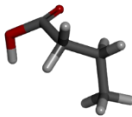
Preparasi Reseptor dan Ligan

Enzim asetilkolinesterase (AChE; PDB ID: 4EY7) dan butirilkolinesterase (BChE; PDB ID: 1P0I) diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) dan digunakan sebagai reseptor target. Preparasi reseptor dilakukan menggunakan *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* dengan menghilangkan molekul air, ligan asli, dan residu non-standar, serta menambahkan atom hidrogen polar. Struktur protein hasil preparasi digunakan pada proses *molecular docking*, sedangkan kompleks protein–ligan asli digunakan untuk validasi metode.

Sebanyak 50 senyawa turunan kafein digunakan sebagai ligan uji. Struktur ligan diperoleh dari PubChem dalam format SDF, kemudian dikonversi ke format PDB dan dipreparasi menggunakan

ChemAxon MarvinSketch melalui pembersihan struktur, protonasi pada pH 7,4, serta optimasi konformasi untuk memperoleh struktur dengan energi minimum sebelum proses *molecular docking*.

Tabel 1. Hasil Preparasi Reseptor AChE (4EY7) dan BChE (1P0I)

Hasil	(AChE) 4EY7	(BChE) 1P0I
Kompleks Protein target dengan native ligand		
Protein		
Native Ligand		

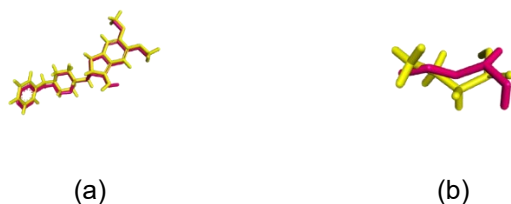
Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi *molecular docking* dilakukan dengan metode re-docking untuk memastikan protokol yang digunakan mampu mereproduksi posisi ligan alami pada sisi aktif reseptor secara akurat (Dias & de Azevedo, 2008). Proses validasi dilakukan menggunakan *AutoDock Tools 1.5.7* dengan ligan alami E20 pada AChE (PDB ID: 4EY7) dan BUA pada BChE (PDB ID: 1P0I). Grid box ditentukan berdasarkan posisi ligan alami pada situs aktif reseptor (Forli et al., 2016).

Keberhasilan validasi dievaluasi berdasarkan nilai *Root Mean Square Deviation (RMSD)*, dengan kriteria valid apabila $RMSD \leq 2,0 \text{ \AA}$ (Morris et al., 1998). Hasil re-docking menunjukkan nilai *RMSD* sebesar $0,57 \text{ \AA}$ untuk AChE dan $0,79 \text{ \AA}$ untuk BChE, yang menandakan bahwa metode docking yang digunakan memiliki akurasi yang sangat baik dan layak digunakan untuk analisis lebih lanjut.

Tabel 2. Koordinat Grid Box dan RMSD Hasil Validasi

Kode PDB	Grid Box			RMSD (Å)
	X	Y	Z	
4EY7	-13.988	-43.906	27.109	0.57
1P0I	138.793	116.578	40.971	0.79



Gambar 5. Overlay hasil re-docking ligan alami pada AChE (4EY7) dan BChE (1P0I)

Nilai $RMSE < 1,0 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa pose ligan hasil *re-docking* memiliki kesesuaian yang sangat tinggi dengan struktur kristalnya (Morris et al., 2009). Visualisasi hasil *re-docking* menunjukkan adanya *overlay* yang baik antara ligan hasil simulasi dan ligan kristal. Dengan demikian, metode *molecular docking* yang digunakan dinyatakan valid dan layak digunakan untuk tahap *molecular docking* senyawa uji.

Molecular Docking

Setelah metode docking tervalidasi, molecular docking dilakukan terhadap seluruh senyawa uji menggunakan parameter grid box yang sama seperti pada tahap validasi. Pendekatan ini bertujuan untuk menjaga konsistensi kondisi simulasi dan memungkinkan perbandingan afinitas ligan secara objektif. Evaluasi hasil molecular docking didasarkan pada energi ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i). Nilai ΔG yang lebih negatif menunjukkan interaksi ligan–reseptor yang lebih stabil, sedangkan nilai K_i yang lebih rendah mengindikasikan afinitas pengikatan yang lebih tinggi (Rena et al., 2022; Srinivasan, 2023). Selain itu, jenis interaksi antara ligan dan residu asam amino pada sisi aktif reseptor juga dianalisis untuk mendukung interpretasi hasil docking.

Tabel 3. Hasil Molecular Docking 5 Senyawa Uji Terbaik Berdasarkan Energi ikatan

Reseptor	Senyawa	ΔG (kkal/mol)	K_i (μM)
4EY7	Ligan Alami (E20)	-10,63	16,18
	Donepezil	-11,55	3,42
	(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	-11,7	2,64
	(E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine	-9,48	112,44
	8-(3-Chlorostyryl)caffeine	-9,4	129,78
	8-((cis-4-Methylcyclohexyl)oxy)caffeine	-9,39	130,29
	Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)-	-9,29	155,07
1P0I	Ligan Alami (BUA)	-3,41	3,15
	Donepezil	-9,15	196,25
	8-(13-Chlorostyryl)caffeine	-8,2	983,6

Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)-	-8,0	1,37
8-(3-Phenylpropyl)-1,3,7-trimethylxanthine	-7,74	2,11
(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	-6,93	8,26
8-(3-Chlorostyryl)caffeine	-6,67	12,97

Hasil Molecular Docking

Pada reseptor AChE (4EY7), senyawa (E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine menunjukkan energi ikatan terendah (-11,70 kkal/mol), lebih rendah dibandingkan ligan alami (-10,63 kkal/mol) dan donepezil (-11,55 kkal/mol), yang mengindikasikan afinitas pengikatan tertinggi terhadap AChE. Pada reseptor BChE (1P0I), donepezil tetap memiliki energi ikatan terendah (-9,15 kkal/mol), meskipun beberapa turunan kafein menunjukkan afinitas yang lebih baik dibandingkan ligan alami. Hasil ini sejalan dengan nilai K_i yang menunjukkan bahwa tidak ada turunan kafein yang melampaui donepezil pada BChE. Secara keseluruhan, (E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine berpotensi sebagai kandidat inhibitor AChE, sementara aktivitas turunan kafein terhadap BChE masih lebih rendah dibandingkan donepezil.

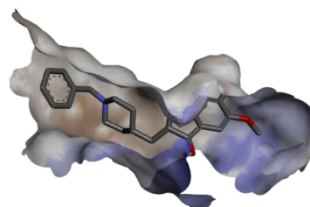
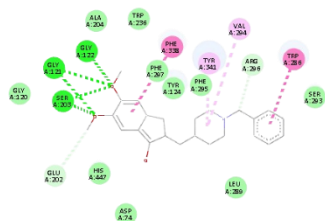
Visualisasi dan Analisis Hasil Molecular Docking

Hasil *molecular docking* divisualisasikan dalam bentuk 2D dan 3D menggunakan *BIOVIA Discovery Studio* untuk mengidentifikasi residu aktif dan jenis interaksi ligan–reseptor. Pada reseptor AChE, ligan alami (E20) dan donepezil distabilkan terutama oleh interaksi hidrofobik tanpa pembentukan ikatan hidrogen. Senyawa turunan kafein menunjukkan pola interaksi yang lebih beragam, dengan terbentuknya ikatan hidrogen pada residu penting seperti TYR A:124, PHE A:295, ARG A:296, dan SER A:203, serta didukung oleh interaksi hidrofobik di dalam kantong aktif. Kombinasi interaksi polar dan non-polar ini menunjukkan potensi afinitas pengikatan yang baik terhadap AChE (Tabel 4. , Gambar 6.).

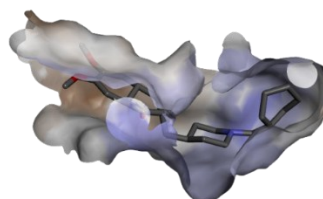
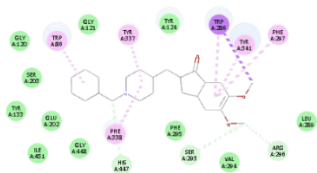
Tabel 4. Analisis Hasil *Molecular Docking* terhadap Reseptor 4EY7

Senyawa	Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik	
		Jumlah	Residu Asam Amino
Ligan Alami (E20)	-	6	GLU A:202 PHE A:338 TYR A:341 VAL A:294 AFG A:296 TRP A:286
Donepezil	-	9	TRP A: 86, TYR A: 337, PHE A: 338, HIS A: 447, SER A: 293, ARG A: 296, TRP A:286, TYR A: 341, PHE A:297
(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	TYR A:124	9	PHE A:335 TYR A:337 HIS A:447 TRP A:256 ASP A:74 TYR A:341 TRP A:286 SER A:293 PHE A:297

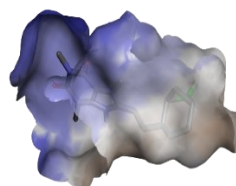
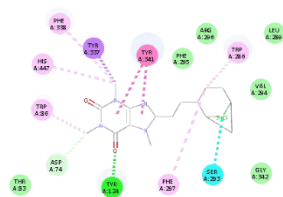
(E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine	PHE A:295 ARG A:296	7	TRP A:86 TYR A:341 PHE A:338 LEU A:289 SER A:293 TRP A:286 TYR A:337
8-(3-Chlorostyryl)caffeine	TYR A:124	6	TYR A:337 TYR A:341 TRP A:286 VAL A:294 SER A:293 ASP A:74
8-((cis-4-Methylcyclohexyl)oxy)caffeine	GLY A:121 SER A:203 TYR A:124	7	PHE A:297 PHE A:338 TRP A:286 VAL A:294 TYR A:341 TYR A:337 HIS A:447
Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)-	THR A:83 ASN A:87	6	TRP A:86 TYR A:341 PHE A:335 TVR A:124 TRP A:286 VAL A:294



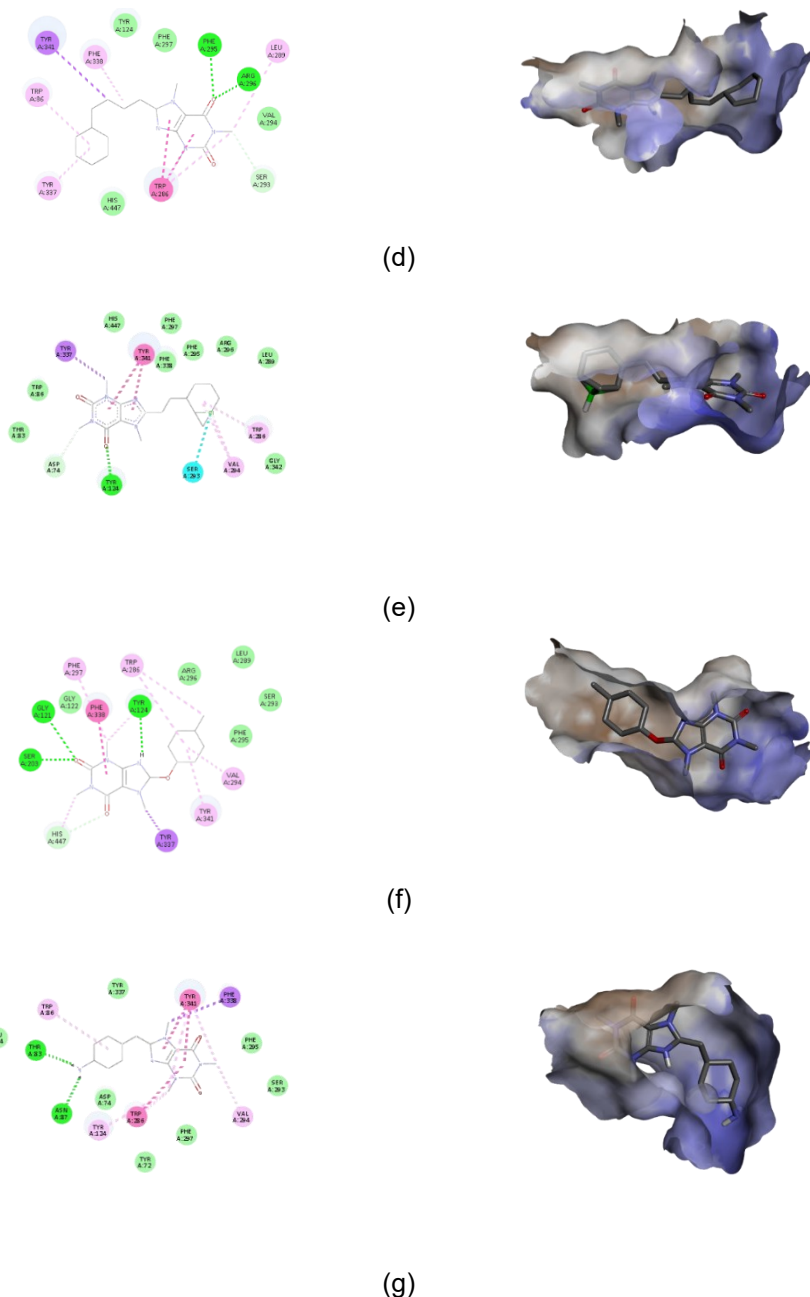
(a)



(b)



(c)

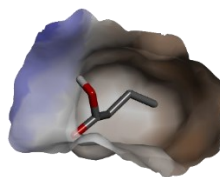


Gambar 6. Visualisasi 2D (kiri) dan 3D (kanan) Senyawa (a) Ligan Alami (E20) (b) Donepezil (c) (E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (d) (E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine (e) 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (f) 8-((cis-4-Methylcyclohexyl)oxy)caffeine (g) Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)- Terhadap Reseptor AChE (4EY7)

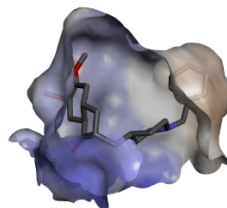
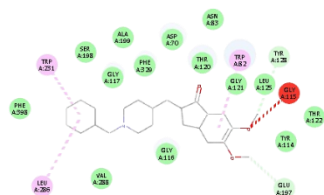
Pada reseptor BChE, ligan alami (BUA) membentuk ikatan hidrogen dengan residu HIS A:438, GLY A:116, dan ALA A:199, sedangkan donepezil didominasi oleh interaksi hidrofobik. Beberapa turunan kafein menunjukkan kesamaan residu interaksi dengan ligan alami, khususnya GLY A:116, GLU A:197, dan HIS A:438, yang mengindikasikan stabilisasi kompleks ligan–reseptor melalui kombinasi interaksi hidrogen dan hidrofobik (Tabel 5. , Gambar 7.).

Tabel 5. Analisis Hasil *Molecular Docking* terhadap Reseptor 1P0I

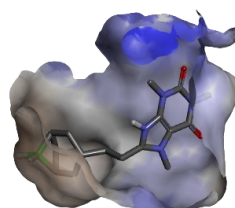
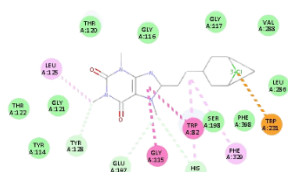
Senyawa	Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik	
		Jumlah	Residu Asam Amino
Ligan Alami (BUA)	HIS A:438 GLY A:116 GLY A:117 ALA A:199	4	PHE A:398 LEU A:286 PHE A:329 TRP A:231
Donepezil	-	6	TRP A:231 LEU A:286 TRP A:82 TYR A:126 GLY A:115 GLU A:197
8-(13-Chlorostyryl)caffeine	-	8	TYR A:114 LEU A:125 TYR A:122 GLU A:197
Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)-	GLU A:197 THR A:120 GLY A:116	3	VAL A: 288 SER A:287 TRP A:82
(E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine	-	8	TYR A:114 LEU A:125 TYR A:122 GLU A:197 HIS A:438 PHE A:329 LEU A:286 TRP A: 231
(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	GLU A:197 TYR A:128	4	TRP A: 82 HIS A: 438 GLY A:115 TRP A:231
8-(3-Chlorostyryl)caffeine	-	6	TYR A:128 GLU A:197 HIS A:438 PHE A:329 LEU A:286 GLY A:115



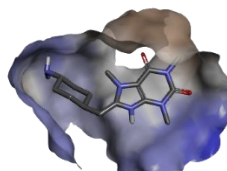
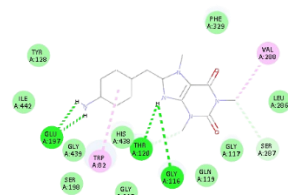
(a)



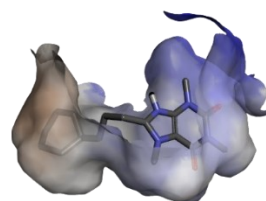
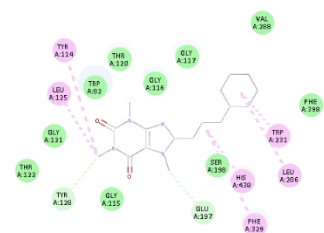
(b)



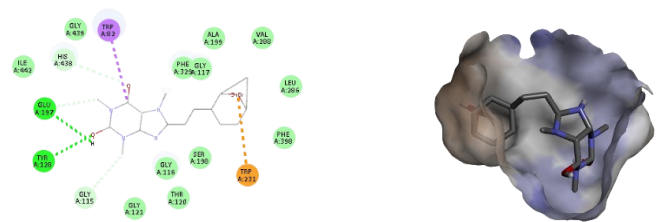
(c)



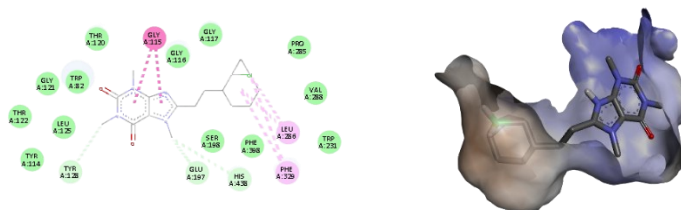
(d)



(e)



(f)



(g)

Gambar 7. Visualisasi 2D (kiri) dan 3D (kanan) Senyawa (a) Ligan Alami (BUA) (b) Donepezil (c) 8-(13-Chlorostyryl)caffeine (d) Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)- (e) (E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine (f) (E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (g) 8-(3-Chlorostyryl)caffeine Terhadap Reseptor BchE (1P0I)

Screening Ligand-Based Drug Likeness (Drug Scan)

Screening ligand-based drug likeness (drug scan) dilakukan untuk mengevaluasi potensi senyawa uji sebagai kandidat obat oral berdasarkan *Lipinski's Rule of Five*, yang mencakup bobot molekul < 500 g/mol, nilai Log P < 5, jumlah donor ikatan hidrogen < 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen < 10, serta refraktivitas molar 40–130 (Lipinski, 2004; Ruswanto, 2015). Hasil *drug scan* yang disajikan pada Tabel 6. menunjukkan bahwa seluruh senyawa uji memenuhi kriteria *Lipinski's Rule of Five* tanpa adanya pelanggaran. Hal ini mengindikasikan bahwa semua senyawa memiliki sifat fisikokimia yang mendukung bioavailabilitas oral dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat obat oral.

Tabel 6. Hasil *Drug Scan* Senyawa Uji Terbaik

No	Nama Senyawa	Parameter				
		Berat Molekul	Donor Hidrogen	Akseptor Hidrogen	Log P / Lipopilitas	Repraksi Molar
		< 500 g/mol	< 5	< 10	< 5	40 - 130
1.	Ligan Alami (E20)	379,49 g/mol	0	4	3,06	115,31
2.	Donepezil	379,49 g/mol	0	4	3,06	115,31

3.	(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	375,22 g/mol	0	3	2,78	95,11
4.	(E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine	322,36 g/mol	0	3	2,56	96,55
5.	8-(3-Chlorostyryl)caffeine	330,77 g/mol	0	3	2,66	92,42
6.	8-((cis-4-Methylcyclohexyl)oxy)caffeine	306,36 g/mol	0	4	1,67	85,26
7.	Caffeine, 8-(p-aminobenzyl)-	299,33 g/mol	1	3	1,44	85,90

Analisis Farmakokimia, Farmakokinetik (ADME dan Toksisitas)

Analisis ADMET menggunakan pkCSM menunjukkan bahwa seluruh turunan kafein memiliki profil farmakokinetik yang baik. Parameter absorpsi menunjukkan nilai *Human Intestinal Absorption* (HIA) tinggi (>90%), permeabilitas Caco-2 yang mendukung absorpsi oral, serta permeabilitas kulit yang rendah (log Kp < -2,5). Hasil ini mengindikasikan potensi absorpsi oral yang baik dan sebanding dengan ligan alami maupun donepezil.

Parameter distribusi (VD_{ss}, logBB, dan logPS) menunjukkan bahwa seluruh senyawa memiliki kemampuan distribusi jaringan dan potensi penetrasi sistem saraf pusat yang memadai. Beberapa turunan kafein, seperti bromostyryl- dan chlorostyryl-caffeine, menunjukkan kapasitas distribusi yang lebih tinggi dibandingkan donepezil.

Pada aspek metabolisme, sebagian besar senyawa tidak menghambat enzim CYP2C19 dan CYP2C9, serta umumnya berperan sebagai substrat CYP3A4, yang mengindikasikan risiko interaksi obat relatif rendah. Nilai total clearance juga menunjukkan profil ekskresi yang masih mendukung aktivitas farmakologis.

Evaluasi toksisitas menunjukkan bahwa seluruh senyawa memiliki nilai LD₅₀ yang masih dalam kisaran aman dan tidak terprediksi hepatotoksik. Secara keseluruhan, hasil ADMET mengindikasikan bahwa turunan kafein memiliki profil farmakokinetik dan keamanan yang menjanjikan untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat inhibitor ganda AChE dan BChE.

Tabel 7. Hasil ADME dan Toksisitas Senyawa Uji

Profil Farmakokinetik	Parameter	Senyawa Uji					
		Ligan Alami (E20)	Donepezil	(E)-8-(3-Bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine	(E,E)-8-(4-Phenylbutadien-1-yl)caffeine	8-(3-Chlorostyryl)caffeine	8-((cis-4-Methylcyclohexyl)oxy)caffeine
Absorpsi	CaCO ₂	1,109	1,234	1,245	1,301	1,239	1,599
	HIA	93,76	97,374	100	100	100	97,63
	Skin Permeability	-2,83	-3,1	-2,879	-2,797	-2,88	-2,76
Distribusi	VD _{ss}	1,259	0,738	1,564	0,068	1,883	-0,347
	BBB	0,399	0,244	0,006	0,262	0,007	-1,039
	CNS Permeability	1,377	-1,396	-2,197	-2,3	-2,219	-3,028
Metabolisme	CYP 2D6 substrate	Yes	No	No	No	No	No
	CYP 2D6 inhibitor	Yes	Yes	No	No	No	No
	CYP 3A4 substrate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
	CYP 3A4 inhibitor	Yes	Yes	No	No	No	No
	CYP 2C8 inhibitor	No	No	No	No	No	No
	CYP 2C19 inhibitor	No	No	No	Yes	No	No
Ekskresi	Total Clearance	1,018	1,005	0,182	0,201	0,238	0,27
	LD ₅₀ AMES	2,485	2,485	2,745	2,058	-2,741	2,801
Toksisitas	Toxicity	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
	Hepatotoksitas	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil studi *in silico*, senyawa turunan kafein menunjukkan potensi sebagai inhibitor ganda enzim asetilkolinesterase (AChE) dan butirilkolinesterase (BChE) berdasarkan analisis *molecular docking* dengan sifat fisikokimia dan profil farmakokinetik. Senyawa (E)-8-(3-bromostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine menunjukkan afinitas ikatan terbaik terhadap AChE dengan interaksi yang stabil pada sisi aktif enzim, meskipun aktivitas inhibisinya terhadap BChE belum melampaui kontrol pembanding donepezil. Analisis *drug-likeness* dan ADMET menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil senyawa yang memenuhi kriteria obat oral, serta beberapa turunan kafein berpotensi memiliki risiko mutagenik. Secara keseluruhan, turunan kafein berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat inhibitor AChE/BChE untuk terapi penyakit Alzheimer.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Bakti Tunas Husada atas fasilitas dan dukungan akademik dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**(15), 1688–1713.
- Biscussi, S. & Murray, A. (2023). Computational approaches in cholinesterase inhibitor discovery for Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, **29**, 112.
- Bombeiro, A. L., Gomes, F. C. A. & de Oliveira, R. M. W. (2020). Caffeine and its neuroprotective role in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, **77**(3), 1137–1154.
- Colovos, C. & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, **2**(9), 1511–1519.
- Dall'Igna, O. P., Fett, P., Gomes, M. W., Souza, D. O., Cunha, R. A. & Lara, D. R. (2007). Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent beta-amyloid-induced cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*, **27**(12), 3459–3466.
- Dias, R. & de Azevedo, W. F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*, **9**(12), 1040–1047.
- Eisenberg, D., Lüthy, R. & Bowie, J. U. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, **277**, 396–404.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, **11**(5), 905–919.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2016). *Situasi Lanjut Usia (Lansia) di Indonesia*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283–291.
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, **1**(4), 337–341.
- Marucci, G., Buccioni, M., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Volpini, R. & Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, **190**, 108352.
- Morris, G. M., Huey, R. & Olson, A. J. (2009). Using AutoDock for ligand–receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics*, **24**, 8.14.1–8.14.40.
- Ozten, S., Yilmaz, S. & Karakurt, A. (2021). Design and molecular docking studies of caffeine derivatives as cholinesterase inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **39**(15), 5563–5574.



- Peng, Y., Li, J., Wang, Z. & Chen, L. (2023). Adverse effects and limitations of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease therapy. *Frontiers in Pharmacology*, **14**, 1187456.
- Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. (2022). Molecular docking and binding affinity interpretation in drug discovery. *Pharmacological Research*, **175**, 105984.
- Ruswanto, R. (2015). Pendekatan komputasi dalam desain dan pengembangan obat. *Jurnal Farmasi Indonesia*, **7**(2), 85–94.
- Ruswanto, R., Nofianti, T., Lestari, T., Septian, A. D., Firmansyah, A. P. & Mardianingrum, R. (2018). Molecular docking and ADMET analysis of bioactive compounds. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8**(6), 1–9.
- Ruswanto, R., Nofianti, T., Lestari, T., Septian, A. D., Firmansyah, A. P. & Mardianingrum, R. (2024). In silico evaluation of bioactive compounds as enzyme inhibitors. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **17**(1), 153–161.
- Sanchez, M. (2013). Computational studies of xanthine derivatives as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**(14), 4120–4124.
- Srinivasan, R. (2023). Binding energy and inhibition constant interpretation in molecular docking. *Computational Biology and Chemistry*, **103**, 107838.
- World Health Organization. (2022). *Dementia Fact Sheet*. Geneva: WHO.
- Yelanchezian, M., Keshavarzi, Z. & Hosseini, S. H. (2022). Neuroprotective effects of caffeine in Alzheimer's disease models. *Neuroscience Letters*, **771**, 136410.
- Zouaghi, S., Khatmi, D. E. & Belaidi, S. (2021). Molecular docking in drug discovery: principles and applications. *Heliyon*, **7**(4), e06852.