

# Sintesis dan Kajian Penambatan Molekular Senyawa 2'-Hidroksicalkon dan Flavonol Tersubstitusi Dimetoksi sebagai Inhibitor Kompleks NS2B-NS3 Serine Protease pada Virus Dengue-2 (DENV-2)

Ihsan Ikhtiarudin<sup>1\*</sup>, Neni Frimayanti<sup>1</sup>, Rudi Hendra<sup>2</sup>, Hilwan Yuda Teruna<sup>2</sup>, Fatma Rahim<sup>1</sup>, Enda Mora<sup>1</sup> dan Abdi Wira Septama<sup>3</sup>

## Artikel Penelitian

- <sup>1</sup> Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, Indonesia.
- <sup>2</sup> Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia.
- <sup>3</sup> Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Tangerang Selatan, Banten, Indonesia.

### Korespondensi:

Ihsan Ikhtiarudin  
ihsanikhtiarudin@stifar-riau.ac.id



Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 International License

**Abstract:** Exploration of the potential compounds as dengue antivirals is one of the efforts that must be considered, because no specific therapy has been found with antiviral drugs that is effective in treating dengue hemorrhagic fever (DHF) patients. The aim of this study is to synthesize and explore the potential of the (*E*)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (compound **1**) and 2-(2,5-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one (compound **2**) as inhibitors of NS2B-NS3 serine protease complex of DENV-2. Synthesis of compounds **1** and **2** was carried out by stirring using a magnetic stirrer. The structures of the two synthesized compounds have been confirmed through UV-Vis, FT-IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopic analyses. Molecular docking was performed using NS2B-NS3 complex (PDB ID: 2FOM) as a receptor. Compounds **1** and **2** were obtained in 21.11% and 66.84% yield, respectively. Based on the molecular docking studies, compounds **2** exhibited more negative binding free energy than compound **1** and panduratin A as a reference inhibitor. Compound **2** was observed to bind to the catalytic triad of NS2B-NS3 complex (His51, Asp75, Ser135) and form hydrogen bond with Gly153. Based on the results, it can be concluded that compounds **1** and **2** can be synthesized by stirring method and the compound **2** showed good potency to be developed as inhibitors of the NS2B-NS3 serine protease complex of DENV-2.

**Keywords:** chalcone, flavonol, organic synthesis, NS2B-NS3, molecular docking

**Abstrak:** Eksplorasi senyawa-senyawa yang potensial sebagai antivirus dengue adalah salah satu upaya yang harus dipertimbangkan, karena belum ditemukannya terapi spesifik dengan obat antivirus yang efektif dalam mengobati pasien demam berdarah dengue (DBD). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mensintesis dan mengeksplorasi potensi dari senyawa (*E*)-3-(2,5-dimetoksifenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on (senyawa **1**) dan 2-(2,5-dimetoksifenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-on (senyawa **2**) sebagai inhibitor kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2. Sintesis senyawa **1** dan **2** dilakukan dengan metode pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Struktur kedua senyawa hasil sintesis telah dikonfirmasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, dan <sup>1</sup>H NMR. Penambatan molekular dilakukan menggunakan kompleks NS2B-NS3 (PDB ID: 2FOM) sebagai reseptor. Senyawa **1** dan **2** diperoleh masing-masing dengan rendemen 21,11 % dan 66,84 %. Berdasarkan kajian penambatan molekular, senyawa **2** memiliki nilai energi bebas ikatan yang lebih negatif dibandingkan dengan senyawa **1** maupun panduratin A sebagai inhibitor pembanding. Senyawa **2** teramati dapat terikat pada *catalytic triad* kompleks NS2B-NS3 (His51, Asp75, Ser135) dan juga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan Gly153. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa **1** dan **2** dapat disintesis dengan metode pengadukan dan senyawa **2** diprediksi memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai inhibitor kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2.

**Kata kunci:** calkon, flavonol, sintesis organik, NS2B-NS3, penambatan molekular

## Pendahuluan

Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh infeksi virus dengue yang ditransmisikan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (1). Diperkirakan sekitar 100-400 juta kasus infeksi baru terjadi tiap tahun, dimana daerah tropis di Asia dan America menunjukkan jumlah infeksi tertinggi (2). Manifestasi klinik infeksi virus dengue dimulai dari infeksi tanpa gejala atau gejala seperti flu ringan yang disebut demam dengue (DD) yang dapat berkembang menjadi demam berdarah dengue (DBD), hingga menjadi gejala yang lebih berbahaya dan dapat mengancam jiwa yang disebut sindrom syok dengue (SSD) (3). Sejauh ini, pengobatan untuk demam berdarah masih berupa terapi suportif dan terapi simptomatis (4), dikarenakan belum ditemukannya terapi spesifik dengan obat antivirus yang efektif dalam membunuh virus *dengue* (5). Selain itu, beberapa peneliti juga telah melaporkan bahwa virus *dengue* juga dapat mengalami mutasi (6) yang dapat menyebabkan virus ini resisten terhadap inhibitor-inhibitor yang sedang dikembangkan oleh para peneliti (7).

Berbagai usaha telah dilakukan oleh para peneliti untuk menemukan senyawa-senyawa yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antivirus DENV-2. Salah satu target terapi dalam penemuan tersebut adalah melalui penghambatan kompleks NS2B-NS3 serine protease. Non-structural serine protease 3 (NS3) merupakan suatu protein yang diperlukan untuk pematangan poliprotein virus dengue. Pengikatan NS3 serine protease ke kofaktor NS2B akan membentuk kompleks NS2B-NS3 serine protease (8) yang diperlukan untuk proses pembelahan protein prekursor virus yang diperlukan untuk replikasi DENV-2 (9). Oleh karena itu, gangguan terhadap fungsi kompleks NS2B/NS3 serine protease oleh suatu inhibitor akan menyebabkan terhambatnya proses replikasi DENV-2 (10).

Senyawa-senyawa calcon dan flavonol telah dilaporkan memiliki potensi yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai antivirus dengue. Sebagai contoh, panduratin A, yang merupakan senyawa alami turunan calcon sikloheksenil hasil isolasi dari tanaman *Boesenbergia rotunda* (L.) (11). Pada konsentrasi 80 ppm, senyawa ini

mampu menghasilkan persentase penghambatan sebesar 66,7% terhadap DENV-2 (12). Senyawa calcon lainnya seperti 2'-hydroxy-4-methoxychalcone pada konsentrasi 25  $\mu$ M juga dilaporkan menghasilkan persentase inhibisi sebesar 99,75% (13). Selanjutnya, beberapa senyawa flavonoid lainnya seperti kloropropoksi 2'-metoksiflavonol juga telah dilaporkan memiliki potensi yang menjanjikan sebagai inhibitor baru NS2B-NS3 serine protease berdasarkan kajian *in silico*. Dalam hal ini, energi bebas pengikatan senyawa tersebut sangat dekat dengan nilai energi bebas pengikatan panduratin A dan juga dapat berinteraksi dengan *catalytic triad* (His51, Asp75, and Ser135) pada kompleks NS2B-NS3 serine protease (14). Pengikatan suatu ligan ke salah satu asam amino pada *catalytic triad* ini sangat penting dalam menghambat replikasi virus, karena ketiga asam amino tersebut terlibat pada proses pembelahan protein prekursor virus yang diperlukan dalam proses replikasi virus DENV-2 (15).

Pada penelitian ini, kami tertarik untuk mensintesis dan mengeksplorasi potensi dari senyawa 2'-hydroxychalcone dan flavonol tersubstitusi dimetoksi sebagai inhibitor NS2B-NS3 serine protease DENV-2. Dalam hal ini, sintesis kedua senyawa dengan metode berbeda sudah pernah dilaporkan (16, 17). Namun, kajian penambatan molekular kedua senyawa sebagai inhibitor kompleks NS2B-NS3 serine protease pada DENV-2 belum pernah dilaporkan sebelumnya.

## Bahan dan Metode

### Bahan

Bahan-bahan untuk sintesis yang digunakan pada penelitian ini yaitu 2'-hidroksiasetofenon 99% (Sigma), 2,5-dimetoksibenzaldehid 99% (Sigma), larutan asam klorida 3N, hidrogen peroksida 30% (Merck), potassium hidroksida for analysis (Merck), aqua DM (Brataco), plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> (Merck Millipore), indikator universal (Merck), dan beberapa pelarut organik seperti etanol absolut (Merck), kloroform p.a (Merck), *n*-heksana, dan etil asetat (teknis, didestilasi).

## Peralatan

Titik leleh diukur dengan Digital Melting Point (DMP-800), analisis HPLC dilakukan dengan HPLC (Shimadzu® Prominence Modular). Spektrum UV diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu® UV-1900i). Spektrum FT-IR diukur dengan spektrofotometer FT-IR (Shimadzu® QATR-S IR-Spirit). Spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa **1** diukur dengan Agilent 500 MHz, sedangkan spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa **2** diukur dengan Bruker Avance Neo 700 MHz. Penambatan molekular dilakukan menggunakan komputer LG Intel(R) Core (TM) i7-8700, CPU 3.20 GHz, RAM 8 GB yang dilengkapi dengan perangkat lunak ChemDraw Professional versi 15.0 (Perkin Elmer), perangkat lunak Molecular Operating Environment (MOE) versi 2022.02 (Chemical Computing Group) dan perangkat lunak Discovery Studio Visualizer versi 2021 (Biovia). Pengukuran titik leleh, analisis HPLC, pengukuran spektrum UV dan spektrum FT-IR, serta kajian penambatan molekular kedua senyawa tersebut dilakukan di Laboratorium Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, sedangkan pengukuran spektrum  $^1\text{H}$  NMR dilakukan di Pusat Riset Kimia, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).

## Metode

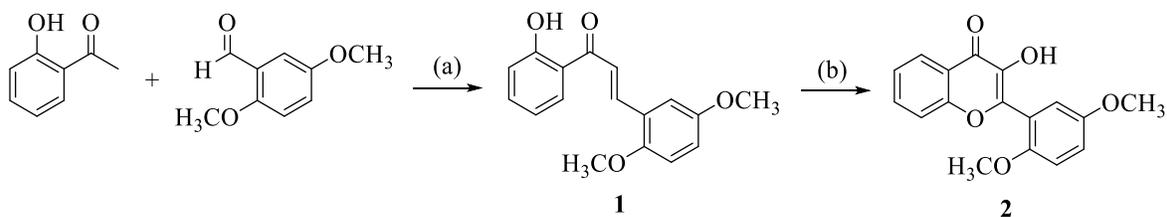
Senyawa **1** disintesis melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt antara 2'-hidroksiasetofenon dan 2,5-dimetoksibenzaldehid dengan suasana basa, sedangkan senyawa **2** disintesis melalui reaksi Algar Flynn Oyamada (AFO) antara senyawa **1** dan hidrogen peroksida dalam suasana yang sama. Rute sintesis kedua senyawa, beserta struktur *starting material* yang digunakan terlampir pada **Gambar 1**. Dalam hal ini, sintesis

kedua senyawa dilakukan mengikuti prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya (18) dengan memodifikasi *starting material* yang digunakan.

## Prosedur Sintesis (E)-3-(2,5-dimetoksifenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on (Senyawa 1)

Sebanyak 20 mmol 2'-hidroksiasetofenon (2,273 g) dan 20 mmol 2,5-dimetoksibenzaldehid (3,323 g) dilarutkan dengan 20 mL etanol absolut di dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan larutan KOH 4N sebanyak 40 mL. Campuran tersebut diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang pada kecepatan 500 rpm selama 4 jam (hingga reaksi selesai). Tahapan reaksi dipantau melalui uji KLT. Setelah reaksi dipastikan selesai, campuran reaksi diasamkan dengan HCl 3N dingin hingga mencapai pH 6. Kemudian campuran didinginkan di dalam lemari pendingin selama semalam. Endapan yang terbentuk disaring dengan kertas saring Whatman 42 menggunakan corong Buchner (*vacuum filtration*), dicuci dengan aquades dingin dan *n*-heksana dingin, lalu dibiarkan kering dalam desikator selama seminggu untuk mendapatkan padatan *crude product*. *Crude product* direkristalisasi dengan etanol panas untuk mendapatkan senyawa **1** murni. Produk murni yang diperoleh ditimbang beratnya, dihitung % rendemennya, dianalisis kemurniannya, dan dikarakterisasi strukturnya.

Senyawa **1**: kristal berwarna kuning, tidak memiliki aroma khas, rendemen 21,11%. Titik leleh: 101-103 °C. Uji KLT (254 dan 366 nm):  $R_f = 0,23$  (*n*-heksana : kloroform = 6:4),  $R_f = 0,68$  (*n*-heksana : etil asetat = 7:3),  $R_f = 0,75$  (*n*-heksana : kloroform 4:6). Kromatogram HPLC (fase terbalik, isokratik, air : asetonitril = 20:80,  $\lambda$  deteksi 388 nm):  $t_R = 8,21$  menit. Spektrum UV-Vis



**Gambar 1.** Rute sintesis senyawa **1** dan **2** menggunakan *starting material* 2'-hidroksiasetofenon dan 2,5-dimetoksibenzaldehid, (a) KOH, EtOH, (b) KOH 3N, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, EtOH

(8 ppm, metanol):  $\lambda_{\max}$  = 388, 310, 277 nm, A = 0,423; 0,431; 0,302. Spektrum FT-IR: bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3069, 3033, 2935, 2833, 1638, 1572, 1490, 1192, 1154, 1019. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz): 12,91 (s, 1H, Ar-2'-OH); 8,18 (d, 1H,  $J$  = 15,5;  $H_\beta$ ); 7,91 (dd, 1H,  $J_1$  = 8,5;  $J_2$  = 1,8; Ar- $H_6'$ ); 7,74 (d, 1H,  $J$  = 16,0;  $H_\alpha$ ); 7,48 (ddd, 1H,  $J_1$  = 8,5;  $J_2$  = 7,3;  $J_3$  = 1,5; Ar- $H_4'$ ); 7,16 (d, 1H,  $J$  = 3,0; Ar- $H_6$ ); 7,01 (dd, 1H,  $J_1$  = 8,5;  $J_2$  = 1,0; Ar- $H_3'$ ); 6,96 (dd, 1H,  $J_1$  = 9,0;  $J_2$  = 3,0; Ar- $H_4$ ); 6,93 (ddd, 1H,  $J_1$  = 8,1;  $J_2$  = 7,4;  $J_3$  = 1,0; Ar- $H_5'$ ); 6,88 (d, 1H,  $J$  = 9,0; Ar- $H_3$ ); 3,89 (s, 3H, Ar-2-OCH<sub>3</sub>); 3,82 (s, 3H, Ar-5-OCH<sub>3</sub>).

### Prosedur Sintesis (2-(2,5-dimetoksifenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-on) (Senyawa 2)

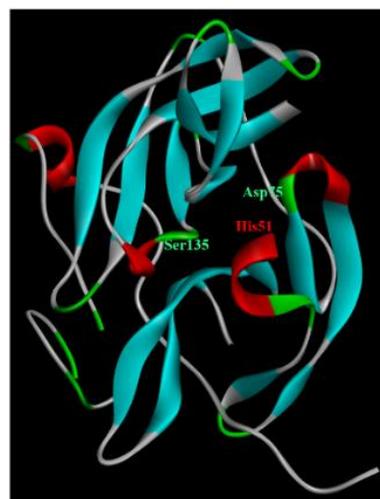
Sebanyak 1 mmol (0,298 g) senyawa 1 dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 4 mL etanol absolut dan 2 mL larutan KOH 3N. Campuran tersebut didinginkan di dalam freezer hingga mencapai suhu 0°C. Setelah itu, sebanyak 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% ditambahkan ke dalam campuran dan diaduk menggunakan magnetic stirrer dengan kecepatan 500 rpm selama 60 menit pada suhu kamar. Tahapan reaksi dipantau melalui uji KLT. Setelah reaksi selesai, ke dalam campuran ditambahkan larutan HCl 3N dingin hingga pH 6. Campuran reaksi didinginkan selama 12 jam dan disaring dengan kertas saring Whatman 40 menggunakan corong buchner, sambil dicuci dengan aquadest dingin dan *n*-heksana dingin, kemudian dibiarkan kering dalam desikator untuk mendapatkan crude product. Crude product kemudian direkristalisasi dengan pelarut etanol absolut panas untuk mendapatkan senyawa 2 murni. Produk murni yang diperoleh ditimbang beratnya, dihitung % rendemennya, dianalisis kemurniannya, dan dikarakterisasi strukturnya.

Senyawa 2: padatan putih kecoklatan, tidak memiliki aroma khas, rendemen 66,84%. Titik leleh: 183-185 °C. Uji KLT (254 dan 366 nm):  $R_f$  = 0,43 (*n*-heksana : etil asetat = 7:3),  $R_f$  = 0,45 (kloroform : etil asetat = 9,5:0,5), dan  $R_f$  = 0,75 (*n*-heksana : etil asetat = 5:5). Kromatogram HPLC (fase terbalik, isokratik, air:asetonitril = 40:60, penambahan asam fosfat,  $\lambda$  deteksi 331 nm):  $t_R$  = 7,38 menit. Spektrum UV-Vis (5 ppm, metanol):  $\lambda_{\max}$  = 331, 290 (sh), 235, 224 nm, A = 0,208;

0,109; 0,359; 0,269. Spektrum FT-IR: bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3272, 3076, 2995, 2968, 2943, 2908, 2836, 1605, 1564, 1497, 1279, 1181, 1112, 1024. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz): 8,28 (dd, 1H,  $J_1$  = 7,7;  $J_2$  = 1,4; Ar- $H_5$ ); 7,68 (ddd, 1H,  $J_1$  = 8,4;  $J_2$  = 7,0;  $J_3$  = 1,4; Ar- $H_7$ ); 7,52 (d, 1H,  $J$  = 8,4; Ar- $H_8$ ); 7,41 (ddd, 1H,  $J_1$  = 8,1;  $J_2$  = 7,0;  $J_3$  = 1,1; Ar- $H_6$ ); 7,15 (d, 1H,  $J$  = 2,8; Ar- $H_6'$ ); 7,05 (dd, 1H,  $J_1$  = 9,1;  $J_2$  = 2,8; Ar- $H_4'$ ); 7,02 (d, 1H,  $J$  = 9,1; Ar- $H_3'$ ); 6,47 (s, 1H, 3-OH); 3,85 (s, 2'-OCH<sub>3</sub>); 3,83 (s, 5'-OCH<sub>3</sub>).

### Prosedur Penambatan Molekular Senyawa 1 dan 2 sebagai Inhibitor Kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2

Struktur ligan digambarkan menggunakan aplikasi ChemDraw Professional 15.0, lalu dioptimasi dengan forcefield MMFF94x, gradient 0,0001 dan disimpan sebagai database ligan menggunakan aplikasi MOE 2022.02. Struktur 3D kompleks NS2B-NS3 (PDB ID: 2FOM) (19) diunduh dari website rcsb.org dalam format PDB. Heteroatom, molekul air, dan ligan dihilangkan menggunakan DSV 2021. Struktur 3D reseptor dioptimasi dengan aplikasi MOE 2022.02. AMBER:EHT dipilih sebagai forcefield dengan gradient 0,01, lalu semua isu terkait struktur 3D reseptor dikoreksi sebelum digunakan untuk penambatan molekular (Gambar 2).



**Gambar 2.** Struktur 3D kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2 (PDB ID: 2FOM) hasil optimasi menggunakan perangkat lunak MOE 2022.02. Catalytic triad terdiri dari asam amino His51, Asp75, and Ser135

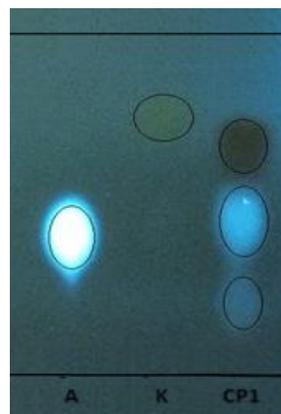
Sisi aktif reseptor ditentukan dengan menu *Site Finder* yang tersedia pada aplikasi MOE 2022.02. *Site 2* (Met49, His51, Asp75, Gly151, Asn152, Gly153, Val154) dan *site 7* (Leu128, Phe130, Ser131, Pro132, Ser135, Tyr150, Gly151, Asn152, Gly153) yang mengandung *catalytic triad* diset sebagai *dummy atoms* dan penambatan molekular dilakukan dengan menargetkan *dummy atoms* tersebut. AMBER10-EHT dipilih sebagai *forcefield*, *triangle matcher* diset sebagai *placement method*, *rigid receptor* diset sebagai *refinement method*, London dG dan GBVI/WSA dG dipilih untuk *scoring*, *pacement poses* dan *refinement poses* masing-masing diset menjadi 50 dan 10. Selanjutnya, kompleks ligan-protein hasil penambatan molekular disimpan dalam format PDB dan divisualisasikan dengan DSV 2021.

## Hasil dan Diskusi

### Sintesis

Hasil sintesis senyawa **1** melalui reaksi kondensasi Claisen Schmidt dengan metode pengadukan diperoleh senyawa **1** murni dengan rendemen 21,11%. Produk murni dalam bentuk kristal berwarna kuning dan tidak memiliki aroma khas diperoleh setelah *crude product* dimurnikan dengan teknik rekristalisasi menggunakan etanol. Dalam hal ini, rekristalisasi dilakukan karena pada kromatogram KLT *crude product* teramati tiga noda ketika diamati di bawah lampu UV 366 nm. Uji KLT terhadap hasil rekristalisasi dengan beberapa variasi fase gerak, menunjukkan noda tunggal yang mengindikasikan tercapainya tujuan rekristalisasi. Selanjutnya dilakukan analisis HPLC untuk memastikan kemurnian dari senyawa **1**. Satu puncak dominan pada waktu retensi 8,21 menit yang muncul pada kromatogram HPLC senyawa **1** menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki kemurnian yang sangat baik. Berdasarkan perbandingan luas area *peak* senyawa **1** dan *peak* pengotor, senyawa **1** memiliki % kemurnian 99,76%. Meskipun senyawa **1** yang diperoleh memiliki kemurnian yang sangat tinggi, % rendemen produk murni yang dihasilkan masih terbilang rendah. Hal ini dikarenakan terdapat beberapa produk samping yang mungkin terbentuk pada proses

pembentukan senyawa **1**. Berdasarkan literatur, produk samping yang mungkin terbentuk pada sintesis analog 2'-hidroksicalkon adalah 2'-hidroksi- $\beta$ -dihidrocalkon dan flavanon (20). Pembentukan produk samping pada sintesis senyawa **1** ini teramati pada kromatogram KLT *crude product* senyawa **1** (CP1), sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Kromatogram KLT *crude product* senyawa **1** (CP1) dibandingkan dengan *starting material* 2,5-dimetoksibenzaldehid (A) dan 2' hidroksiasetofenon (K). Noda senyawa **1** memiliki pendar berwarna hitam, sedangkan produk samping memiliki pendar berwarna biru.

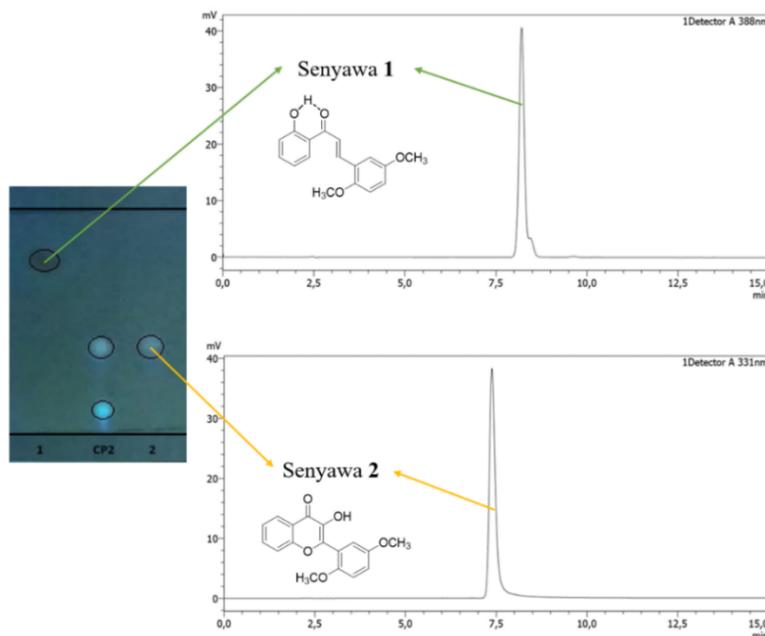
Hasil sintesis senyawa **2** melalui reaksi Algar-Flynn-Oyamada dengan metode pengadukan diperoleh senyawa **2** murni dengan rendemen 66,84%. Produk murni dalam bentuk padatan berwarna putih kecoklatan dan tidak memiliki aroma khas diperoleh setelah *crude product* dimurnikan dengan teknik rekristalisasi menggunakan etanol. Dalam hal ini, rekristalisasi dilakukan karena pada kromatogram KLT *crude product* teramati dua noda ketika diamati di bawah lampu UV 366 nm. Uji KLT terhadap hasil rekristalisasi dengan beberapa variasi fase gerak menunjukkan noda tunggal yang mengindikasikan telah tercapainya tujuan rekristalisasi. Selanjutnya dilakukan analisis HPLC untuk memastikan kemurnian dari senyawa **2**. Satu puncak dominan pada waktu retensi 9,98 menit yang muncul pada kromatogram HPLC senyawa **2** menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki kemurnian yang baik. Berdasarkan perbandingan luas area *peak* senyawa **2** dan *peak* pengotor, senyawa **2**

memiliki % kemurnian 100%. Dalam hal ini, rendemen senyawa **2** yang diperoleh sudah cukup dan lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen pada sintesis senyawa **1**. Namun demikian, optimasi metode sintesis kedepannya tentu masih diperlukan untuk mendapatkan senyawa **1** dan **2** dengan rendemen yang lebih baik. Kromatogram KLT dan HPLC senyawa murni **1** dan **2**, serta kromatogram KLT *crude product* senyawa **2** dapat dilihat pada **Gambar 4**.

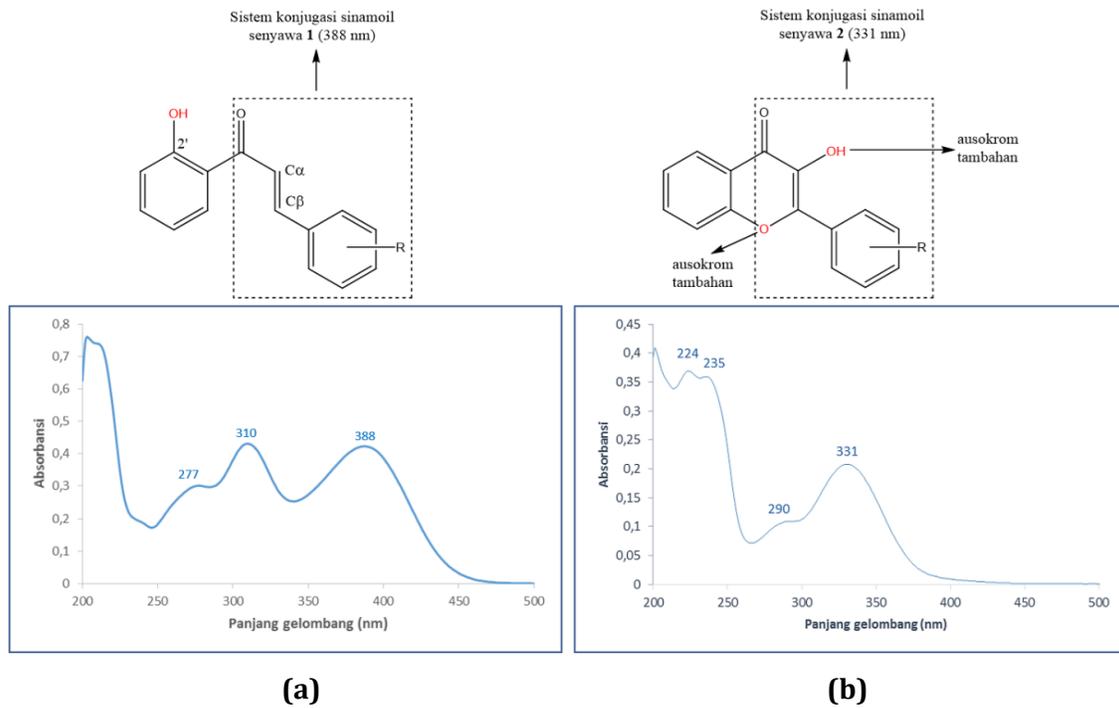
Hasil karakterisasi struktur senyawa **1** dan **2** melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, dan <sup>1</sup>H NMR juga menunjukkan bahwa kedua senyawa hasil sintesis memiliki struktur yang sesuai dengan struktur molekul target yang diinginkan, sebagaimana dapat diamati pada **Gambar 5-7**. Berdasarkan **Gambar 5**, dapat diamati bahwa terdapat perbedaan yang mencolok antara nilai panjang gelombang maksimum pita I pada spektrum UV senyawa **1** (388 nm) dan senyawa **2** (331 nm). Perbedaan ini disebabkan kehadiran dua gugus ausokrom pada sistem konjugasi sinamoil senyawa **2**. Ausokrom adalah suatu gugus fungsi yang tidak memiliki ikatan phi, namun memiliki pasangan elektron bebas. Terikatnya suatu gugus ausokrom pada suatu kromofor atau suatu sistem konjugasi dapat

menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang serapan dan intensitas serapan dari kromofor atau sistem konjugasi tersebut (21).

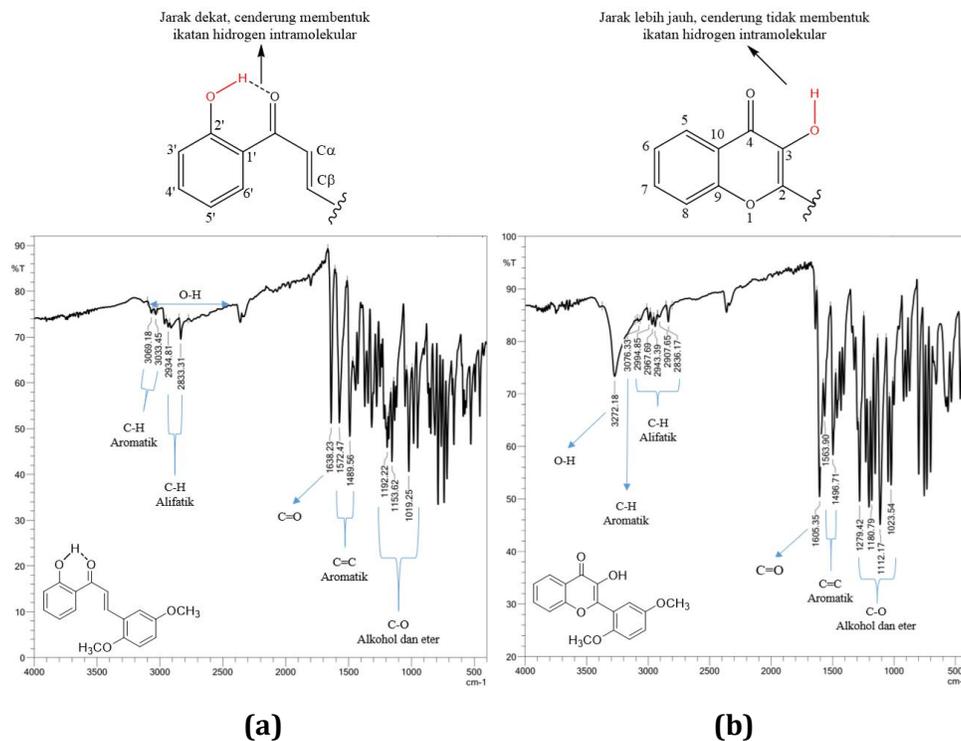
Pada tahapan sintesis senyawa **2** melalui reaksi AFO, cincin C terbentuk melalui reaksi siklisasi antara gugus 2'-OH dengan atom C<sub>β</sub> senyawa **1** dan juga melibatkan pemasukan gugus OH pada C<sub>α</sub> senyawa **1** (18). Hal tersebut tentunya memberikan pengaruh terhadap panjang gelombang maupun intensitas serapan sistem konjugasi sinamoil senyawa **2**, yang menyebabkan terjadinya pergeseran yang mencolok dari serapan pita I kedua senyawa. Dalam hal ini, jenis pergeseran yang terjadi adalah pergeseran hipsokromik, suatu pergeseran serapan ke arah panjang gelombang yang lebih pendek karena adanya substitusi (21), dimana atom H<sub>α</sub> dan H<sub>β</sub> pada sistem konjugasi sinamoil senyawa **1** masing-masing disubstitusi oleh atom oksigen. Hasil yang sama juga dapat diamati pada sintesis senyawa analog 2'-hidroksicalkon dan flavonol lainnya. Dimana pita I senyawa 2'-hidroksicalkon tersubstitusi trimetoksi muncul pada panjang gelombang 363 nm, sedangkan pita I senyawa flavonol tersubstitusi trimetoksi muncul pada panjang gelombang yang lebih pendek, yaitu 354 nm (18).



**Gambar 4.** Kromatogram KLT senyawa **1** murni (1), *crude product* senyawa **2** (CP2), dan senyawa **2** murni (2). Kromatogram HPLC senyawa **1** dan senyawa **2** murni.



**Gambar 5.** Perbandingan spektrum UV-Vis kedua senyawa hasil sintesis, **(a)** spektrum UV-Vis senyawa 1, **(b)** spektrum UV-Vis senyawa 2. Pita I senyawa 2 muncul pada panjang gelombang yang lebih pendek

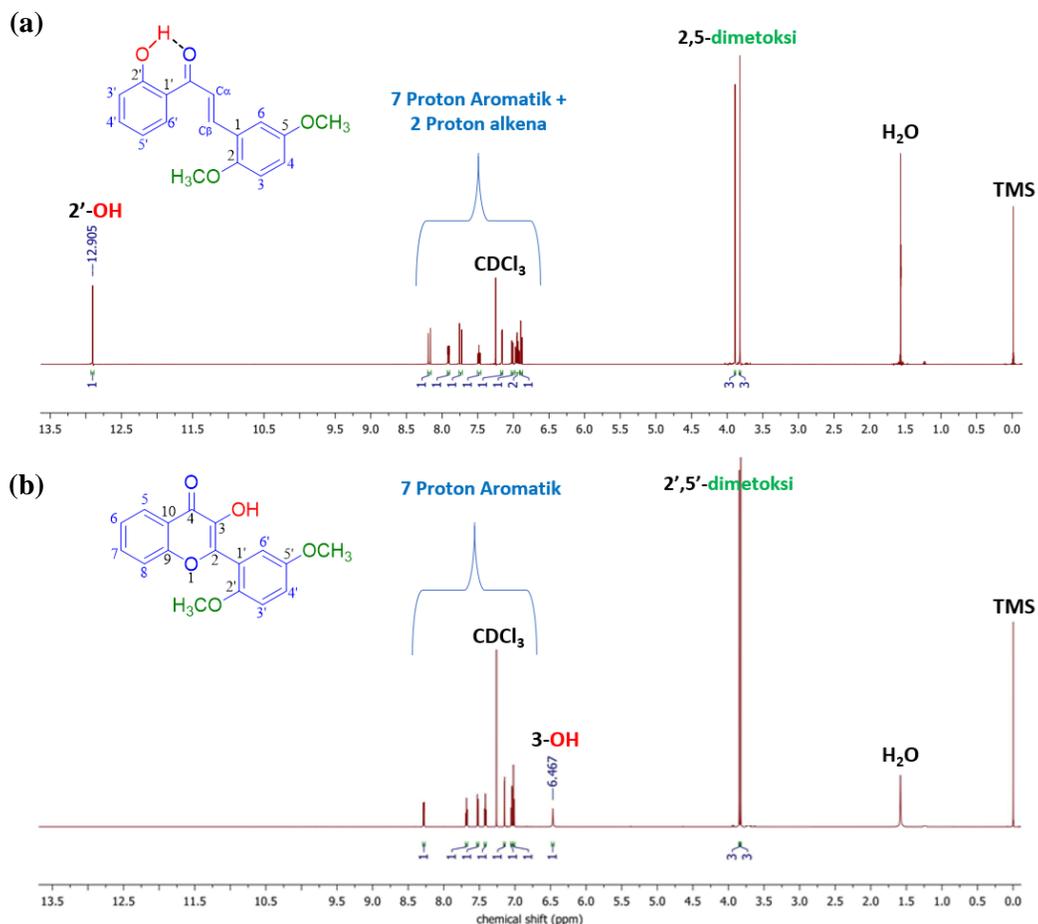


**Gambar 6.** Perbandingan posisi gugus OH dan spektrum FT-IR kedua senyawa hasil sintesis, **(a)** spektrum FT-IR senyawa 1, **(b)** spektrum FT-IR senyawa 2

Berdasarkan **Gambar 6**, dapat diamati bahwa pita serapan yang muncul pada spektrum FT-IR kedua senyawa telah sesuai dengan jenis ikatan maupun jenis gugus fungsi yang terdapat pada kedua senyawa hasil sintesis. Selain itu juga dapat diamati bahwa terdapat perbedaan signifikan antara pita serapan O-H pada senyawa **1** dan senyawa **2**. Hal ini dikarenakan perbedaan posisi gugus OH pada kedua senyawa. Pada senyawa **1**, gugus OH yang terikat pada C2' cincin A membuat atom hidrogen gugus tersebut cenderung membentuk ikatan hidrogen intramolekular dengan atom oksigen gugus karbonil yang terletak pada posisi orto (posisi 1,2), dikarenakan jarak antara atom H pada gugus OH dan atom O pada gugus karbonil menjadi berdekatan secara ruang. Pada senyawa **2**, gugus OH yang terikat pada C3 cincin C membuat jarak antara atom H pada gugus OH menjadi sedikit

berjauhan dari atom O pada gugus karbonil, sehingga ikatan hidrogen intramolekular cenderung tidak terbentuk pada kasus ini.

Perbedaan posisi gugus OH inilah yang menyebabkan perbedaan pada nilai bilangan gelombang dan bentuk pita serapan gugus OH yang muncul pada spektrum FT-IR tersebut. Hasil yang sama juga dapat diamati pada sintesis senyawa analog 2'-hidroksicalkon dan flavonol lain yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Dimana serapan gugus 2'-OH senyawa 2'-hidroksi-3,4,5-trimetoksicalkon muncul sangat melebar dengan intensitas lemah, sedangkan pita serapan gugus 3-OH pada senyawa 3',4',5'-trimetoksi flavonol muncul dengan bentuk melebar pada bagian dasar dan meruncing pada bagian puncak dengan intensitas sedang (18).



**Gambar 7.** Perbandingan spektrum <sup>1</sup>H NMR kedua senyawa hasil sintesis, **(a)** spektrum <sup>1</sup>H NMR senyawa **1**, **(b)** spektrum <sup>1</sup>H NMR senyawa **2**

Perbedaan posisi dari kedua gugus OH ini juga dapat diamati melalui spektrum  $^1\text{H}$  NMR kedua senyawa. Berdasarkan **Gambar 7**, dapat diamati bahwa sinyal proton gugus 2'-OH pada senyawa **1** muncul pada pergeseran kimia 12,91 ppm, sedangkan sinyal proton gugus 3-OH pada senyawa **2** muncul pada pergeseran kimia 6,47 ppm. Posisi proton 2'-OH yang secara ruang lebih dekat dengan gugus karbonil, sehingga cenderung berikatan ikatan hidrogen intramolekular yang menyebabkan proton 2'-OH pada senyawa **1** menjadi lebih tidak terperisai atau lebih tidak terlindungi (*deshielded*), sehingga sinyal proton tersebut akan muncul pada pergeseran kimia yang lebih besar (*downfield*). Hasil ini sesuai dengan beberapa literatur yang telah melaporkan bahwa sinyal proton 2'-OH pada berbagai senyawa analog 2'-hidroksicalokon tersubstitusi halogen pada cincin B yang muncul pada rentang pergeseran kimia 12,70-12,74 ppm (22), untuk analog 2'-hidroksicalkon tersubstitusi trimetoksi pada cincin B muncul pada rentang pergeseran kimia 12,83 ppm (18). Senada dengan hal di atas, literatur lain juga melaporkan bahwa sinyal 2'-OH pada senyawa flavonoid dapat muncul pada rentang pergeseran kimia 12,08-14,04 ppm, tergantung jenis dan posisi substituen yang berada di sekitarnya (23). Selain itu, nilai tetapan penjodohan ( $J$ ) untuk proton  $\text{H}_\alpha$ - $\text{H}_\beta$  senyawa **1** diperoleh sebesar 15,5-16,0 Hz. Nilai tersebut menunjukkan bahwa senyawa calkon tersubstitusi (senyawa **1**) memiliki konfigurasi entgegen ( $E$ ), dimana proton  $\text{H}_\alpha$  dan  $\text{H}_\beta$  pada senyawa **1** terletak pada sisi yang berlawanan (22, 24).

Berdasarkan literatur, proton 3-OH pada senyawa flavonol atau 3-hidroksiflavan akan muncul pada pergeseran kimia yang jauh lebih kecil (*upfield*) yaitu berkisar antara 6,56-7,10 ppm untuk flavonol tersubstitusi halogen (25) dan berkisar antara 6,44-7,06 ppm untuk senyawa flavonol tersubstitusi metoksi (14, 18, 26, 27). Selain itu, juga dapat diamati bahwa total integrasi sinyal proton yang muncul pada spektrum  $^1\text{H}$  NMR kedua senyawa telah sesuai dengan jumlah proton pada kedua senyawa. Dalam hal ini terdapat 16 proton pada senyawa **1** dan 14 proton pada senyawa **2**. Dalam hal ini, kehilangan 2 gugus proton ini dikarenakan

terjadinya reaksi oksidasi pada proses pembentukan senyawa flavonol.

### Penambatan Molekular

Setelah senyawa hasil sintesis dikonfirmasi strukturnya melalui analisis spektroskopi, selanjutnya dilakukan kajian penambatan molekular untuk mengeksplorasi potensi kedua senyawa sebagai antivirus dengue. Kajian ini menggunakan protein dalam bentuk kompleks NS2B-NS3 serine protease (PDB ID: 2FOM) sebagai reseptor. Struktur kristal NS2B-NS3 serine protease dari DENV-2 ini memiliki resolusi 1,50 Å, sehingga memenuhi persyaratan struktur protein yang akan digunakan sebagai reseptor pada kajian penambatan molekular (< 2,5 Å) (28).

Virus dengue termasuk ke dalam kelompok flavivirus. Proses replikasi pada flavivirus membutuhkan pemrosesan yang benar terhadap poliprotein virus oleh NS3 serine protease. Dimana untuk pemrosesan tersebut, diperlukan aktivasi NS3 serine protease oleh suatu kofaktor berupa protein yang disebut NS2B. Dari 62 asam amino yang ada pada kofaktor NS2B, terdapat 47 asam amino yang berperan penting dalam proses pembentukan kompleks NS2B-NS3 serine protease (19). Dalam hal ini, kompleks tersebut diperlukan untuk pembelahan protein prekursor virus yang digunakan untuk replikasi DENV-2 (9). Oleh karena itu, gangguan terhadap fungsi kompleks NS2B/NS3 serine protease oleh suatu inhibitor akan menyebabkan terhambatnya proses replikasi DENV-2 (10).

Pada kajian penambatan molekular ini, panduratin A yang telah terbukti secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2 (12) digunakan sebagai inhibitor pembanding. Panduratin A merupakan senyawa alami turunan calkon sikloheksenil yang diisolasi dari tanaman *Boesenbergia rotunda* (L.) (11). Berdasarkan literatur, panduratin A dapat berinteraksi dengan asam amino yang terdapat pada *catalytic triad* (His51, Asp75, and Ser135) kompleks NS2B-NS3 serine protease (14, 26), di mana pengikatan suatu ligan ke salah satu asam amino pada *catalytic triad* ini sangat penting karena ketiga asam amino tersebut terlibat dalam pemotongan atau pembelahan protein prekursor

virus yang diperlukan dalam proses replikasi virus DENV-2 (15).

Hasil penambatan panduratin A ke NS2B-NS3 serine protease menggunakan aplikasi MOE 2022.02 diperoleh nilai energi bebas pengikatan sebesar -5,64 kcal/mol dengan nilai RMSD 1,18, sebagaimana dapat dilihat pada **Tabel 1**. Hasil ini sangat mendekati literatur yang melaporkan nilai energi bebas ikatan panduratin A adalah sebesar -5,18 kcal/mol (29). Berdasarkan **Gambar 8 (a)** dapat diamati bahwa panduratin A dapat terikat dengan kuat pada *triad catalytic* kompleks NS2B-NS3 serine protease melalui interaksi hidrofilik, yaitu ikatan hidrogen dengan residu asam amino His51 dan Ser135, serta melalui interaksi van der Waals dengan residu asam amino Asp75 dan interaksi hidrofobik pi-alkil dengan residu asam amino His51. Selain itu, panduratin A juga teramati berikatan hidrogen dengan residu asam amino Gly153.

Senyawa **1** memiliki nilai energi bebas ikatan sebesar -5,76 kcal/mol. Berdasarkan **Gambar 8 (b)**, senyawa **1** teramati membentuk interaksi hifrofilik dengan cara yang berbeda terhadap *catalytic triad* kompleks NS2B-NS3 DENV-2 dibandingkan dengan panduratin A. Dalam hal ini, senyawa **1** terikat dengan His51 dan Ser135 melalui interaksi van der Waals, serta membentuk interaksi hidrofilik melalui ikatan pi-anion dengan Asp75. Meskipun senyawa **1** tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan *catalytic triad*, namun dapat diamati bahwa

senyawa **1** memiliki nilai energi bebas pengikatan yang lebih negatif dibandingkan panduratin A sebagai inhibitor pembanding. Hal ini mungkin dikarenakan senyawa **1** memiliki orientasi pengikatan yang berbeda dengan panduratin A.

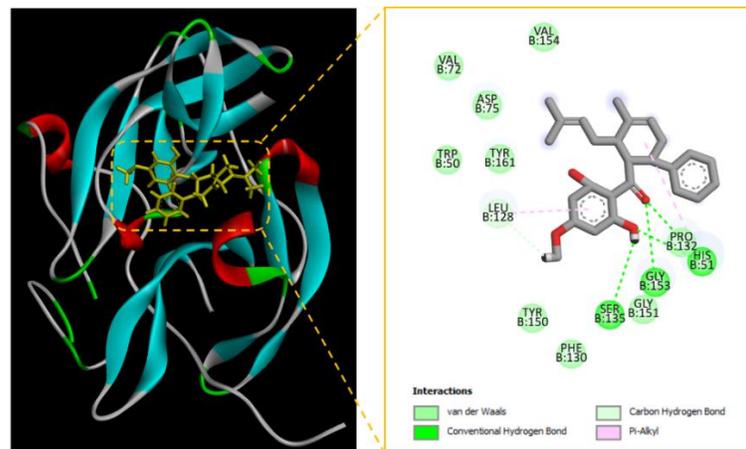
Senyawa **2** memiliki nilai energi bebas ikatan sebesar -5,86 kcal/mol. Berdasarkan **Gambar 8 (c)**, senyawa **2** juga teramati membentuk interaksi hidrofilik dengan cara yang berbeda terhadap *catalytic triad* kompleks NS2B-NS3 DENV-2 dibandingkan dengan panduratin A. Dalam hal ini, senyawa **2** terikat dengan residu asam amino His51 melalui interaksi hidrofobik pi-pi *stacked*, berikatan dengan residu asam amino Ser135 melalui interaksi van der Waals, dan membentuk interaksi hidrofilik dengan residu asam amino Asp75 melalui interaksi pi-anion. Namun senyawa **2** masih memiliki kesamaan dengan panduratin A, dimana senyawa **2** juga teramati dapat membentuk interaksi hidrofilik melalui ikatan hidrogen dengan residu asam amino Gly153, yang diketahui berperan penting dalam menghasilkan aktivitas antagonis terhadap virus *dengue* (30).

Sama halnya dengan senyawa **1**, senyawa **2** juga memiliki energi bebas ikatan yang lebih negatif dibandingkan panduratin A. Hal ini diduga karena senyawa **1** dan **2** dapat berinteraksi dengan Asp75, salah satu asam amino *catalytic triad* pada kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2 melalui interaksi hidrofilik pi-anion. Dimana interaksi ini tidak teramati pada

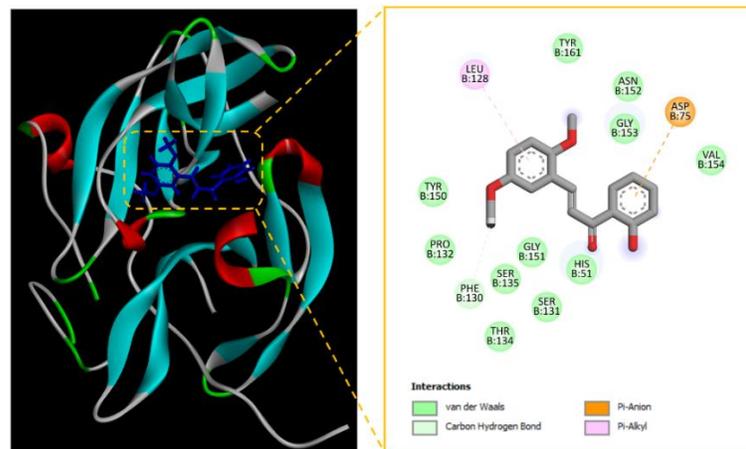
**Tabel 1.** Hasil penambatan senyawa **1** dan **2** ke *catalytic triad* kompleks NS2B-NS3 protease DENV-2

Senyawa	S (kcal/mol)	RMSD	Interaksi	
			Ikatan Hidrogen	Interaksi lainnya
Panduratin A	-5,64	1,18	<b>His51</b> (2,87; 3,03 Å), <b>Ser135</b> (2,73 Å), Gly153 (2,43 Å)	Trp50 <sup>a</sup> , His51 <sup>c</sup> , Val72 <sup>a</sup> , <b>Asp75</b> <sup>a</sup> , Leu128 <sup>b,c</sup> (2,84 Å), Phe130 <sup>a</sup> , Pro132 <sup>a</sup> , Tyr150 <sup>a</sup> , Gly151 <sup>a</sup> , Val154 <sup>a</sup> , Tyr161 <sup>a</sup>
Senyawa <b>1</b>	-5,76	0,70	-	<b>His51</b> <sup>a</sup> , <b>Asp75</b> <sup>d</sup> , Leu128 <sup>c</sup> , Phe130 <sup>b</sup> (2,84 Å), Ser131 <sup>a</sup> , Pro132 <sup>a</sup> , Thr134 <sup>a</sup> , <b>Ser135</b> <sup>a</sup> , Tyr150 <sup>a</sup> , Gly151 <sup>a</sup> , Asn152 <sup>a</sup> , Gly153 <sup>a</sup> , Val154 <sup>a</sup> , Tyr161 <sup>a</sup>
Senyawa <b>2</b>	-5,86	1,01	Gly153 (2,71 Å)	<b>His51</b> <sup>c</sup> , <b>Asp75</b> <sup>d</sup> , Leu128 <sup>c</sup> , Phe130 <sup>b</sup> (2,94 Å; 3,07 Å), Ser131 <sup>a</sup> , Pro132 <sup>a</sup> , Thr134 <sup>a</sup> , <b>Ser135</b> <sup>a</sup> , Tyr150 <sup>a</sup> , Gly151 <sup>a</sup> , Asn152 <sup>a</sup> , Val154 <sup>a</sup> , Tyr161 <sup>a</sup>

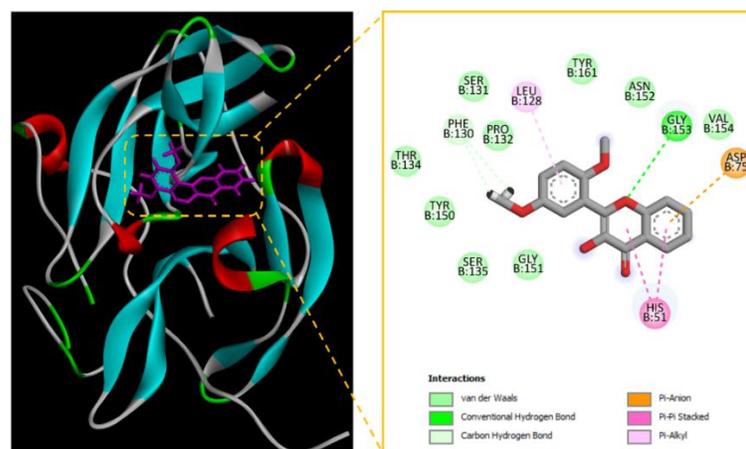
<sup>a</sup> = van der Waals, <sup>b</sup> = karbon-hidrogen, <sup>c</sup> = hidrofobik (pi-alkil atau pi-pi *stacked*), <sup>d</sup> = pi-anion



(a)



(b)



(c)

**Gambar 8.** Visualisasi interaksi antara kompleks NS2B-NS3 serine protease DENV-2 dengan ligan-ligan yang dikaji, (a) panduratin A, (b) senyawa 1, (c) senyawa 2

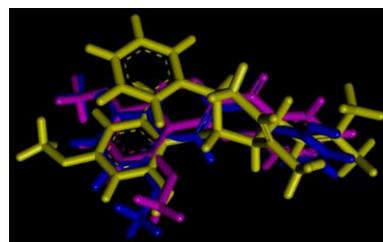
panduratin A. Semakin negatif nilai energi bebas pengikatan, maka akan semakin mudah suatu ligan berikatan dengan protein yang ditargetkan. Berdasarkan hasil penambatan molekular tersebut dapat diamati bahwa senyawa **2** memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa **1** maupun panduratin A sebagai inhibitor kompleks NS2B-NS3 serine protease pada DENV-2.

Selain *catalytic triad* (His51, Asp75, Ser135), pada sisi aktif NS3 protease juga terdapat 4 sub-kantong, yaitu sub-kantong 1 (Asp129, Ser135, Tyr150, Tyr161), sub-kantong 2 (Asp75, Gly82, Trp83, Lys84, Asn152), sub-kantong 3 (Leu85, Glu86, Gly87), dan sub-kantong 4 (Val154). Interaksi dengan residu-residu asam amino yang terdapat pada sub-sub kantong bersama dengan *catalytic triad* membantu dalam afinitas pengikatan dan berkontribusi pada karakteristik penghambatan suatu senyawa (15). Dalam hal ini, baik senyawa **1**, senyawa **2**, maupun panduratin A teramati berinteraksi lebih dominan dengan residu-residu asam amino yang terdapat pada sub-kantong 1 (Ser135, Tyr150, Tyr161) dibandingkan dengan residu-residu yang terdapat pada sub-kantong lainnya. Selain itu, ketiga senyawa juga teramati berinteraksi dengan residu Val154 yang terdapat pada sub-kantong 4, sedangkan interaksi dengan residu Asn152 yang terdapat pada sub-kantong 2 hanya teramati pada senyawa **1** dan **2**. Sementara itu, interaksi residu pada sub-kantong 3 tidak teramati pada ketiga senyawa yang dikaji.

Umumnya, senyawa yang mampu berinteraksi pada sisi pengikatan enzim dan menghambat aktivitas enzim memiliki *electrophilic warhead*. Senyawa-senyawa calkon dan flavonol diketahui memiliki gugus karbonil keton dan akseptor Michael yang dapat bertindak sebagai *electrophilic warhead* (31, 32). Berdasarkan **Gambar 8(a)**, dapat diamati bahwa gugus karbonil pada panduratin A terlibat dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan residu His51, Pro132, dan Gly153. Kemudian berdasarkan **Gambar 8(b)** dapat diamati bahwa gugus karbonil pada senyawa **1** berinteraksi dengan His51 melalui interaksi van der Waals. Selain itu, berdasarkan **Gambar 8(c)** juga dapat diamati bahwa cincin C senyawa **2** yang mengandung akseptor Michael berinteraksi

dengan His51 melalui interaksi Hydrophobic Pi-Pi stacked. Dalam hal ini, interaksi dengan residu His51 ini penting, karena merupakan asam amino pada sisi katalitik kompleks NS2B-NS3 protease pada DENV-2.

Berdasarkan hasil *overlay* orientasi pengikatan ligan-ligan yang dikaji pada penelitian ini, dapat diamati bahwa senyawa **1** dan **2** terlihat memiliki pose pengikatan yang sangat mirip. Hal inilah yang membuat senyawa **1** dan **2** sama-sama dapat membentuk interaksi pi-anion dengan residu asam amino Asp75 dan interaksi van der Waals dengan residu asam amino Ser135. Namun, ketika orientasi pengikatan kedua senyawa hasil sintesis dibandingkan dengan orientasi pengikatan panduratin A, terlihat beberapa perbedaan. Hal inilah yang menyebabkan perbedaan interaksi yang terbentuk. Dalam hal ini, panduratin A terikat dengan Asp75 melalui interaksi van der Waals dan bukan melalui interaksi pi-anion. Selain itu, panduratin A terikat dengan Ser135 melalui ikatan hidrogen dan bukan melalui interaksi van der Waals. Meskipun demikian, dapat diamati bahwa masih terdapat beberapa kemiripan orientasi pengikatan dari ketiga senyawa yang dikaji, terutama pada bagian cincin aromatik yang mengikat substituen metoksi yang terlihat berhimpit, sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar 9**.



**Gambar 9.** *Overlay* orientasi pengikatan senyawa **1** (biru), senyawa **2** (ungu), dan panduratin A (kuning)

Berdasarkan hasil penambatan molekular tersebut, dilihat dari nilai energi bebas ikatan kedua senyawa hasil sintesis yang lebih negatif dari panduratin A dan beberapa interaksi penting yang dapat terbentuk antara kedua senyawa hasil sintesis dengan asam amino yang berperan penting dalam penghambatan aktivitas katalitik dari kompleks NS2B-NS3 serine protease, maka dapat diprediksi bahwa senyawa **1** dan **2** memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan

sebagai inhibitor NS2B-NS3 pada DENV-2. Dalam hal ini, senyawa **2** memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa **1**. Namun, evaluasi *in vitro* tentunya diperlukan untuk memastikan hasil kajian *in silico* ini.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa senyawa **1** dan **2** dapat disintesis dengan metode pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Berdasarkan hasil penambatan molekular, kedua senyawa hasil sintesis memiliki nilai energi bebas pengikatan lebih negatif daripada panduratin A sebagai inhibitor pembanding. Selain itu, kedua senyawa hasil sintesis juga teramati dapat berinteraksi dengan ketiga asam amino pada *catalytic triad* (His51, Asp75, dan Ser135) dari kompleks NS2B-NS3 serine protease. Namun hanya senyawa **2** yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan Gly153. Senyawa **2** tampaknya memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai inhibitor kompleks NS2B-NS3 serine *protease* DENV-2.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Pendidikan Vokasi yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Kerjasama Dalam Negeri (PKDN) 2024 dengan nomor kontrak 008/LL10/PG-APTV/AL.04/2024 dan 07.05.15.P3M.STIFAR.III.2024. Selain itu, penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memfasilitasi pengukuran spektrum NMR kedua senyawa hasil sintesis dan kepada panitia penyelenggara yang telah memberikan kesempatan untuk mendiseminasikan hasil penelitian ini secara oral pada Pertemuan Ilmiah Tahunan (PIT) Ikatan Apoteker Indonesia (IAI) Tahun 2024 di Mataram, NTB.

## Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dalam pelaksanaan penelitian maupun penulisan artikel ini.

## Referensi

1. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, van Bortel W. The global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015;4:e08347.
2. Kularatne SA, Dalugama C. Dengue Infection: Global Importance, Immunopathology and Management. *Clin Med (Lond)*. 2022;22(1):9-13.
3. Harapan H, Michie A, Mudatsir M, Sasmono RT, Imrie A. Epidemiology of Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia: Analysis of Five Decades Data from the National Disease Surveillance. *BMC Research Notes*. 2019;12(1):4-9.
4. Dharma WST, Astriani R, Rukmana AL. Pemantauan Terapi Obat Pada Pasien Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) di Ruang Perawatan Flamboyant Rumah Sakit Omni Pulomas. *Social Clinical Pharmacy Indonesia Journal*. 2017;2(1):58-68.
5. Marbawati D, Umniyati SR. Uji Anti Virus Senyawa Kurkumin dan PGV-0 pada Virus Dengue-2 dengan RT-PCR. *BALABA*. 2016;12(1):15-22.
6. Torres MC, Martins Karl AL, Müller Pereira da Silva M, Dardenne LE, Bispo de Filippis AM. In Silico Analysis of Dengue Virus Serotype 2 Mutations Detected at the Intrahost Level in Patients with Different Clinical Outcomes. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e0025621.
7. Obi JO, Gutiérrez-Barbosa H, Chua JV, Deredge DJ. Current Trends and Limitations in Dengue Antiviral Research. *Trop Med Infect Dis*. 2021;6(4):180.
8. Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the Yellow Fever Virus NS2B Protein: Effects On Proteolytic Processing, NS2B-NS3 Complex Formation, and Viral Replication. *J Virol*. 1993;67(11):6797.
9. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both Nonstructural Proteins NS2B and NS3 are Required for the Proteolytic Processing of Dengue Virus Nonstructural Proteins. *J Virol*. 1991;65(5):2467-2475.
10. Rothan HA, Han HC, Ramasamy TS, Othman S, Rahman NA, Yusof R. Inhibition of Dengue NS2B-NS3 Protease and Viral Replication in

- Vero cells by Recombinant Retrocyclin-1. *BMC Infect Dis.* 2012;12:314.
11. Prashantha CN, Patil A, Priya S. Designing of Anti Dengue Drug Molecule against Insilico Modeled Target DC-Sign (CD-209). *International Journal of Advanced Computer Research.* 2013;3(12):215-223.
  12. Kiat TS, Phippen R, Yusof R, Ibrahim H, Khalid N, Rahman NA. Inhibitory Activity of Cyclohexenyl Chalcone Derivatives and Flavonoids of Fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), Towards Dengue-2 Virus NS3 Protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2016;16:3337-3340.
  13. Suroengrit A, Yuttithamnon W, Srivarangkul P, Pankaew S, Kingkaew K, Chavasiri W, Boonyasuppayakorn S. Halogenated Chrysin Inhibit Dengue and Zika Virus Infectivity. *Scientific Reports.* 2017;7:13696.
  14. Frimayanti N, Ikhtiarudin I, Septama AW, Susanty A, Isroq NA. Synthesis, In Silico and Structural Insight of Flavonol Derivative Compounds as New Competitive Dengue NS2B/NS3 Protease Inhibitor. *Journal of Research in Pharmacy.* 2023;27(3):1157-1169.
  15. Abduraman MA, Hariono M, Yusof R, Rahman NA, Wahab HA, Tan ML. Development of a NS2B/NS3 Protease Inhibition Assay Using AlphaScreen® Beads for Screening of Anti-Dengue Activities. *Heliyon.* 2018;4(12):e01023.
  16. Pawlak A, Henklewska M, Hernández Suárez B, Łuźny M, Kozłowska E, Obmińska-Mrukowicz B, Janeczko T. Chalcone Methoxy Derivatives Exhibit Antiproliferative and Proapoptotic Activity on Canine Lymphoma and Leukemia Cells. *Molecules.* 2020;25(19):4362.
  17. Li Z, Ngojeh G, DeWitt P, Zheng Z, Chen M, Lainhart B, Li V, Felpe P. Synthesis of a library of glycosylated flavonols. *Tetrahedron Letters.* 2008;49(51):7243-7245.
  18. Ikhtiarudin I, Frimayanti N, Nasution MR, Adawiyah R, Mora E, Septama AW. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian In Silico Potensi 2'-Hidroksicalkon dan Flavonol Tersubstitusi Trimetoksi sebagai Inhibitor Main Protease (M<sup>Pro</sup>) SARS-CoV-2. 2024. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia.* 2024; 20(1):98-119.
  19. Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. Structural Basis for the Activation of Flaviviral NS3 Proteases from Dengue and West Nile Virus. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2006;13:372-373.
  20. Zamri A, Teruna HY, Ikhtiarudin I. Pengaruh Variasi Daya Terhadap Selektivitas Reaksi Sintesis Analog 2'-Hidroksicalkon menggunakan Iradiasi Gelombang Mikro. *Molekul.* 2016;11(2):299-307.
  21. Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi.* Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas, Padang.
  22. Ikhtiarudin I, Lelani, Zamri A, Teruna HY, Yuharmen. Sintesis dan Uji Toksisitas Senyawa Analog Kalkon Turunan 2'-Hidroksiasetofenon dan Halobenzaldehid. *Jurnal Photon.* 2014;5(1):57-63.
  23. Yu Y, Pauli GF, Huang L, Gan LS, van Breemen RB, Li D, McAlpine JB, Lankin, DC, Chen SN. 2020. Classification of Flavonoid Metabolomes via Data Mining and Quantification of Hydroxyl NMR Signals. *Analytical Chemistry.* 2020;92(7):4954-4962.
  24. Ikhtiarudin I, Agistia N, Harlianti T, Zamri, A. Sintesis dan Potensi Aktivitas Tabir Surya Senyawa Analog Kalkon Turunan 3'-Hidroksiasetofenon dan 4-Metoksibenzaldehid. *Jurnal Photon.* 2019; 10(1):1-12.
  25. Ikhtiarudin I, Frimayanti N, Teruna HY, Zamri A. Microwave-Assisted Synthesis, Molecular Docking Study and In Vitro Evaluation of Halogen Substituted Flavonols Against P388 Murine Leukimia Cells. *Applied Science and Technology.* 2017;1(1):375-381.
  26. Frimayanti N, Ikhtiarudin I, Dona R, Putri I, Septama AW. Synthesis of 3'-Methoxy

- Flavonol and Its Derivatives as Potential Inhibitors for Dengue NS2B/NS3 and Molecular Insight into Binding Interaction. *Pharmacy Education*. 2023;23(2):231-243.
27. Ikhtiarudin I, Agistia N, Frimayanti N, Mora E, Dona R, Nofriyanti, Rahmawati, RD, Zamri A. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian Molecular Docking Senyawa 4'-Metoksi Flavonol sebagai Inhibitor Main Protease (MPro) SARS-CoV-2. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 2022;26(1):8-14.
28. Santoso, B., 2017. Pengaruh Volume Gridbox Pada Docking Senyawa dalam Stelechocarpus burahol Terhadap Protein Homolog Antiinflamasi TRPV1. In: Rahayu, H.S.E et al., (Eds), Proceeding 6<sup>th</sup> University Research Colloquium 2017: Seri MIPA dan Kesehatan. URECOL5, 9 September 2017. Universitas Muhammadiyah Magelang, Magelang, Indonesia, 321-328
29. Habibi R, Herfindo N, Hendra R, Teruna HY, Zamri A. Synthesis and Molecular Docking Study of 1-(3-Chloropropyl)-3,5-bis((E)-4-methoxybenzylidene)piperidin-4-one as Dengue Virus Type 2 (DEN2) NS2B/NS3 Protease Inhibitor Candidate. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*. 2020;5(1):14-22.
30. Frimayanti N, Chee CF, Zain SM, Rahman NA. Design of New Competitive Dengue NS2B/NS3 Protease Inhibitors-a Computational Approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(2):1089-1100.
31. Thapa P, Upadhyay SP, Singh V, Boinpelly VC, Zhou J, Johnson DK, Gurung P, Lee ES, Sharma R, Sharma M. Chalcone: A potential scaffold for NLRP3 inflammasome inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2023;7:100100.
32. Monica GL, Bono A, Lauria A, Martorana A. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease for Treatment of COVID-19: Covalent Inhibitors Structure-Activity Relationship Insights and Evolution Perspectives. *J. Med. Chem*. 2022;65(19):12500-12534.