



***In Silico* Study of Compounds in Noni (*Morinda citrifolia* L.) against Main-Protease in SARS-CoV-2**

Samuel Lestyawan¹, Maitsa A. Fakhirah¹, Riska Prasetiawati^{2*}, Diyani S. Anggraeni², Muchtaridi Muchtaridi³

¹ Program Studi Sarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

²Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Garut, Garut, Jawa Barat, Indonesia

³Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi,
Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

Submitted 24 September 2024; Revised 26 November 2024; Accepted 11 December 2024; Published 03 January 2025

*Corresponding author: riska@uniga.ac.id

Abstract

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), is a contagious illness transmitted from person to person. The main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 is a promising target for therapeutic intervention. Noni (*Morinda citrifolia* L.), a plant commonly used in traditional medicine in Indonesia for treating COVID-19, has been investigated for its potential anti-SARS-CoV-2 compounds. However, the specific bioactive compounds targeting SARS-CoV-2 remain unidentified. This study aimed to identify and predict the activity of compounds in Noni against Mpro through pharmacophore modeling, molecular docking, drug-likeness, and pharmacokinetic analysis using LigandScout®, Discovery Studio Visualizer®, AutoDock®, SwissADME, Pre-ADMET, and Toxtree®. Among the 40 compounds analyzed, quercetin emerged as the most promising candidate, with a pharmacophore fit score of 41.05, a binding energy (ΔG) of -7.79 kcal/mol, and interactions with amino acid residues GLY143A and MET165A, similar to the native ligand. These findings suggest that quercetin from *M. citrifolia* has the potential to be developed as a novel anti-SARS-CoV-2 therapeutic agent.

Keywords: Anti-SARS CoV-2, main protease, molecular docking, noni, pharmacophore screening

Studi *In Silico* Senyawa pada Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Main-Protease pada SARS-CoV-2

Abstrak

Coronavirus Disease-2019 (COVID-19), yang disebabkan oleh *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2), merupakan penyakit menular yang dapat ditransmisikan antar manusia. *Main protease* (Mpro) dari SARS-CoV-2 adalah target yang cukup strategis untuk pengembangan terapi. Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), tanaman yang sering digunakan dalam pengobatan tradisional di Indonesia untuk mengatasi COVID-19, telah diteliti untuk mengidentifikasi senyawa potensialnya terhadap SARS-CoV-2. Namun, senyawa bioaktif spesifik yang menargetkan SARS-CoV-2 belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memprediksi aktivitas senyawa dalam mengkudu terhadap Mpro melalui pemodelan farmakofor, penambatan molekuler, *drug-likeness*, dan prediksi profil farmakokinetik menggunakan program *LigandScout*®, *Discovery Studio Visualizer*®, *AutoDock*®, *SwissADME*, *Pre-ADMET*, dan *Toxtree*®. Dari 40 senyawa yang dianalisis, kuersetin muncul sebagai kandidat paling menjanjikan dengan *pharmacophore fit score* sebesar 41,05, energi bebas Gibbs (ΔG) sebesar -7,79 kcal/mol, dan interaksi dengan residu asam amino GLY143A dan MET165A, serupa dengan ligan alami. Temuan ini menunjukkan bahwa kuersetin dari *M. citrifolia* berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat agen untuk terapi anti-SARS-CoV-2.

Kata Kunci: Anti SARS-CoV-2, main protease, mengkudu, penambatan molekul, skrining farmakofor

1. Pendahuluan

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) merupakan wabah penyakit yang mengancam hampir seluruh belahan dunia pada akhir tahun 2019 hingga saat ini. Kemunculan COVID-19 pertama kali terjadi di Kota Wuhan, China, pada akhir Desember 2019 dengan nama awal 2019 *Novel Coronavirus* (2019-nCoV).¹ Penyakit ini disebabkan oleh sebuah virus bernama *Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2* (SARS-CoV-2) dan memiliki gejala awal yang ditimbulkan berupa demam, flu, batuk, kelelahan, produksi dahak berlebih, sakit kepala, diare dan sesak napas atau dyspnea. Dalam keadaan parah, penyakit ini dapat menimbulkan ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) yang menjadi salah satu penyebab kematian pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2.^{2,3}

Main protease (Mpro) merupakan salah satu enzim fungsional pada virus ini yang penting dalam pemecahan poliprotein virus menjadi protein fungsional. Maka dari itu, enzim ini menjadi salah satu target kerja obat yang prospektif dalam pengobatan COVID-19.⁴ Sudah ditemukan beberapa obat COVID-19 yang menargetkan enzim ini seperti nirmatrelvir dan enzitrelvir.⁵ Namun, pengobatan ini tentunya bukan tanpa kekurangan. Uji klinis yang ada menunjukkan bahwa pasien COVID-19 yang menggunakan nirmatrelvir menderita efek samping neurologi dan gastrointestinal seperti kehilangan rasa pengecap, pusing, dan diare. Selain itu, penggunaan nirmatrelvir juga dilaporkan menyebabkan banyak kasus *recurrence* atau kekambuhan kembali COVID-19 pada pasien.⁶ Sementara itu, berdasarkan uji klinis lain, penggunaan enzitrelvir juga dilaporkan menyebabkan efek samping pada biokimia darah seperti penurunan HDL (*high-density lipoprotein*), peningkatan trigliserida, dan lain-lain.⁷ Kekurangan tersebut menyebabkan diperlukannya pencarian obat baru untuk mengobati COVID-19 yang diharapkan memiliki efek samping yang lebih rendah. Salah satu metode pencarian obat baru adalah dengan meneliti aktivitas dari senyawa-senyawa di tanaman herbal dikarenakan pada umumnya tanaman herbal dilaporkan

memiliki efek samping yang lebih sedikit.⁸

Tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) merupakan tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia dan merupakan anggota famili Rubiaceae. Tanaman ini mengandung suatu senyawa bernama damnacanthal yang sudah terbukti memiliki aktivitas antivirus.⁹ Tanaman ini juga sudah banyak digunakan untuk mengobati gejala-gejala COVID-19.¹⁰ Akan tetapi, penelitian ilmiah mengenai aktivitas masing-masing senyawa dalam tanaman ini terhadap penyakit COVID-19 belum dilakukan.

Penelitian ini akan melakukan pendekatan *in silico*. Pendekatan ini sering dijadikan sebagai skrining awal dalam pencarian obat baru karena bersifat cepat, murah, dan memiliki tingkat risiko yang rendah. Sudah banyak obat yang beredar saat ini yang penemuan awalnya bermula dari pendekatan *in silico* seperti kaptopril, ritonavir, dan simetidin.¹¹ Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui prediksi aktivitas senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Mpro sebagai anti SARS-CoV-2 melalui pendekatan studi komputasi.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian terdiri dari perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi Intel® Core™ i3 processor M370 (2,40 GHz, RAM 4,00 GB, System type 64-bit), dan sistem operasi Windows 7. Selain itu, terdapat beberapa perangkat lunak yang terdiri dari LigandScout® 4.4.5, BIOVIA Discovery Studio Visualizer® 2021, ChemDraw® Ultra 12.0, AutoDock Tools® 1.5.7., AutoDock4.2® Notepad++®, ToxTree® dan situs online yang terdiri dari Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), DUD-E (<https://dude.docking.org/>), Binding Database (<https://www.bindingdb.org/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) serta Pre-ADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>).

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan berupa *reseptor main protease* (Mpro) dari SARS-CoV-2 dengan kode PDB 7BUY, yang didapatkan dari metode difraksi sinar-X dengan resolusi 1,60 Å yang diunduh dari *Protein data Bank* (PDB). Reseptor dengan kode PDB yang sama telah digunakan pada penelitian sebelumnya untuk simulasi *molecular docking*.¹² Senyawa uji yang digunakan berupa 40 senyawa dari tanaman mengkudu yang dibuat struktur digitalnya menggunakan ChemDraw® Ultra 12.0 atau mengunduh dari situs PubChem.

Untuk skrining farmakofor, digunakan *database* senyawa aktif dan tidak aktif (*decoy*) terhadap enzim HIV-1 protease yang diunduh dari website DUD-E. Enzim ini memiliki mekanisme kerja yang serupa dengan main protease sehingga bisa dijadikan alternatif untuk main protease yang tidak tersedia di DUD-E.¹³ Digunakan juga ligan pembanding N-Benzil-2(2,6-dimetilfenoksi)-N-(((3R,4S)-4-([isobutil (fenilsulfonil) amino]metil)pirilodin-3-YL)metil]asetamid yang tertambat pada reseptor HIV-1 protease dengan kode PDB 1XL2, yang didapatkan dari metode difraksi sinar-X dengan resolusi 1,50 Å.

2.3. Prosedur

2.3.1. Skrining Farmakofor

Database senyawa yang aktif dan tidak aktif terhadap reseptor HIV-1 protease diunduh dari situs DUD-E dengan format (.mol2). Selain itu, disiapkan juga ligan pembanding dengan mengunduh reseptor HIV-1 protease dari *Protein Data Bank* dengan kode PDB 1XL2 dan memisahkan ligan alaminya dengan *Discovery Studio Visualizer*® 2021 dan menyimpan dengan format (.ldb). Ligan uji disiapkan dengan mengunduh dari situs PubChem atau menggambar dengan ChemDraw® Ultra 12.0 kemudian diminimisasi energinya dan disimpan dengan format (.ldb).

Model farmakofor didapatkan dari situs *Binding Database* dan disesuaikan dengan *database* senyawa aktif menggunakan *LigandScout*® 4.4.5. Model yang didapatkan kemudian divalidasi dengan melihat parameter AUC (*area under the curve*) dan

GH (*goodness of hit*) pada ROC (*receiver operator characteristic*) curve. Model yang paling baik kemudian disimpan dengan format (.pmz).

Skrining farmakofor dilakukan dengan menggunakan model terbaik untuk menyeleksi seluruh ligan uji. Nilai yang dilihat adalah *pharmacophore fit score* di mana semakin besar nilai tersebut, semakin mirip model farmakofor ligan uji dengan senyawa yang aktif pada reseptor tersebut.

2.3.2. Molecular Docking

Struktur makromolekul *main protease* diunduh dari situs *Protein Data Bank* dengan kode PDB 7BUY dengan format (.pdb). Setelah itu, dilakukan pemisahan reseptor dengan ligan alami dengan *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*® dan masing-masing disimpan dengan format (.pdb). Ligan uji disiapkan dengan mengunduh dari situs PubChem atau menggambar dengan ChemDraw® Ultra 12.0 kemudian diminimisasi energinya dan disimpan dengan format (.pdb). Dengan menggunakan *AutoDock Tools*®, ligan dan reseptor ditambahkan muatan dan torsi kemudian disimpan dengan format (.pdbqt).

Validasi *molecular docking* dilakukan dengan metode *re-docking* yaitu penambatan kembali ligan alami ke reseptor. Reseptor dan ligan alami diatur parameter grid dan parameter penambatannya pada *AutoDock Tools*®, kemudian dilakukan perintah penambatan dengan *AutoDock*® 4.2. Simulasi dilakukan sebanyak 100 kali pengulangan dengan mengatur GA (*genetic algorithm*) run sebanyak 100 pada parameter penambatan. Parameter yang dilihat adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Simulasi *molecular docking* dengan ligan uji dilakukan dengan prosedur yang sama. Reseptor dan ligan uji (.pdbqt) dibuat parameter grid dan parameter penambatan (100 GA runs) pada *AutoDock Tools*®, kemudian dilakukan perintah penambatan dengan *AutoDock*® 4.2. Parameter yang dilihat adalah perubahan energi bebas Gibbs yang akan sebanding dengan konstanta inhibisi, dan asam amino yang berikatan dengan ligan.

2.3.3. Prediksi *Drug-Likeness*

Drug-likeness dari seluruh senyawa uji dilihat berdasarkan aturan *Lipinski's rule of 5* menggunakan situs SwissADME. Senyawa uji dibuat dalam bentuk SMILES dan diunggah ke situs tersebut. Kemudian dilakukan *running* dan hasil parameter Lipinski akan didapatkan.

2.3.4. Prediksi Profil Farmakokinetika dan Toksisitas

Prediksi profil farmakokinetika dilakukan di situs PreADMET dengan cara menggambar struktur 2 dimensi senyawa pada situs dan melakukan *running*. Parameter yang dilihat adalah nilai *human intestinal absorption* (HIA), *cancer coli-2* (CaCo-2) *penetration*, dan *plasma protein binding* (PPB).

Prediksi nilai toksisitas dilakukan pada ToxTree® dengan memasukkan format SMILES dari senyawa dan melakukan *running*. Parameter yang dilihat adalah nilai *Crammer's Rule*, *Benigni/Bossa rulebase*, dan *Kroes TTC decision tree*.

3. Hasil

3.1. Skrining Farmakofor

Model farmakofor yang diperoleh memiliki enam ikatan hidrofobik, satu akseptor ikatan hidrogen, dan dua donor ikatan hidrogen yang digunakan untuk mencari ligan uji. Hasil validasi yang diperoleh dari *ROC curve* mendapatkan nilai GH (*Goodness of Hit*) yang dihasilkan sebesar 0,8 atau 80% dan nilai AUC sebesar 0,91 atau 91%. Nilai tersebut memenuhi syarat yaitu GH bernilai 0,7 – 0,8¹⁴ dan AUC >0,5¹⁵ sehingga model dianggap valid.^{14,15} Senyawa aktif yang dikenali (TP) 17 dari 20 senyawa dan senyawa *decoy* (FP) 4 dari 100 senyawa maka total hits berjumlah 21 hits.

Setelah model yang valid didapatkan, dilakukan skrining farmakofor terhadap senyawa uji. Berdasarkan hasil skrining farmakofor, didapatkan 13 senyawa yang memiliki kesamaan farmakofor dengan senyawa yang aktif. Nilai *pharmacophore fit* yang dimiliki masing-masing senyawa beraneka ragam dari 32,2 – 41,05 (Tabel 1), dengan kuersetin merupakan senyawa dengan kemiripan farmakofor yang paling baik.

Tabel 1. Hasil Skrining Farmakofor dari Senyawa Bioaktif *M. citrifolia*

No	Nama Senyawa	Matching Features	Fit Score
1.	N-Benzil-2(2,6-dimetilfenoksi)-N-(((3R,4S)-4-{[isobutil (fenilsulfonil)amino]metil}pirilodin-3-YL)metil]asetamid (Ligan Pembanding)		-
2.	Alizarin		34,73
3.	Damnacanthal		34,47
4.	Isoleusin		33,41
5.	Kaempferol		40,80
6.	Kuersetin		41,05
7.	Leusin		33,03
8.	Lusidin		39,52
9.	Metionin		33,35
10.	Morindon		32,20
11.	Rubiadin		39,61
12.	Rutin		33,98
13.	Tirosin		33,88
14.	Metionin		33,35
15.	Triptofan		33,01

Keterangan: Kuning = Ikatan hidrofobik; Merah = Akseptor ikatan hidrogen; Hijau = Donor ikatan hidrogen

3.2. Molecular Docking

Tahap ini diawali dengan validasi. Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD ≤ 2 Å yaitu 1,389 Å, sehingga memenuhi syarat untuk dilanjutkan dengan ligan senyawa uji.¹⁶ Sistem tersebut kemudian digunakan untuk melakukan simulasi *molecular docking* pada 40 senyawa bioaktif pada *M. citrifolia* (Tabel 2).

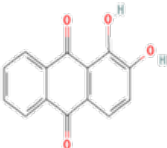
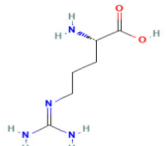
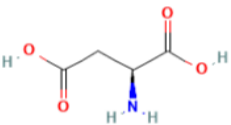
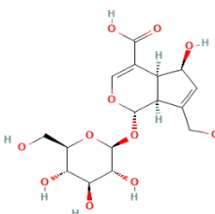
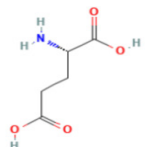
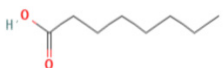
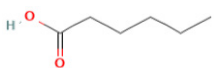
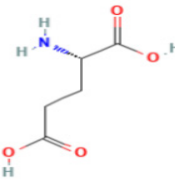
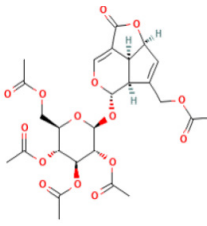
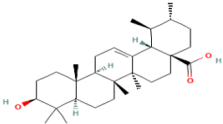
Suatu senyawa dikatakan poten untuk dijadikan obat apabila memiliki nilai perubahan energi bebas Gibbs sebesar 6 kkal/mol atau lebih.¹⁷ Terdapat 12 senyawa yang dikatakan poten (berwarna hijau) dengan rutin dan beta-sitosterol merupakan senyawa yang terbaik dari segi perubahan energi bebas Gibbs yang mencapai lebih dari 9 kkal/mol. Konstanta inhibisi merupakan besaran turunan dari perubahan energi bebas Gibbs sehingga nilainya akan sebanding.¹⁸

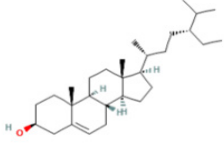
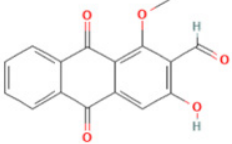
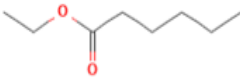
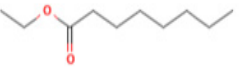
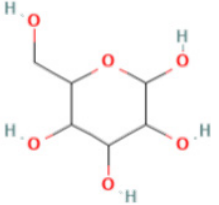
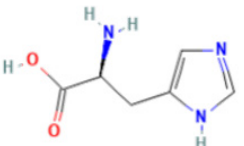
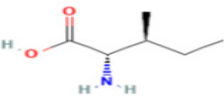
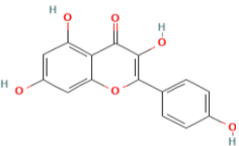
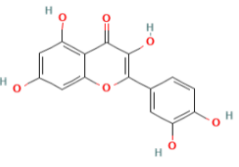
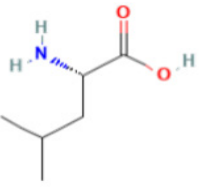
Berdasarkan penelitian referensi

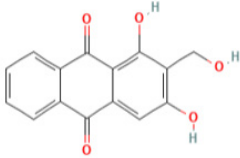
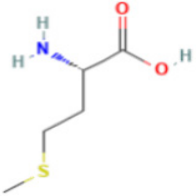
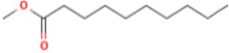
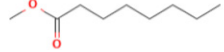
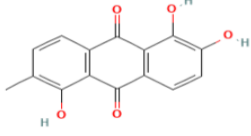
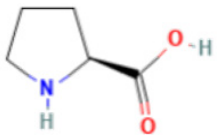
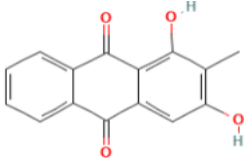
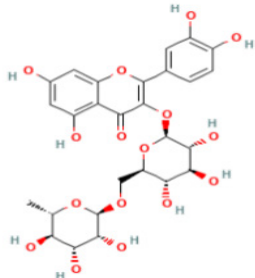
dari enzim Mpro pada PDB 7BUY, residu asam amino penting yang berikatan dengan ligan alami adalah GLY143A, CYS145A, SER144A, MET165A, dan HIS164A yang berikatan dengan interaksi hidrofobik dan ikatan hydrogen.¹⁹ Namun, berdasarkan hasil *re-docking*, asam amino kunci yang berinteraksi dengan ligan alami hanyalah GLY143A dan MET165A (Tabel 2). Maka, kedua asam amino tersebut yang akan dibandingkan dengan ligan lain (warna hijau). Dari 12 senyawa yang poten, hanya 4 yang memiliki interaksi dengan kedua asam amino yaitu rutin, kuersetin, asam deasetilasperulosidat, dan asperulosid tetraasetat. Rutin merupakan senyawa dengan perubahan energi bebas Gibbs terbesar dan berikatan dengan kedua asam amino kunci, maka rutin merupakan senyawa yang berpotensi dari *molecular docking* untuk berinteraksi dengan Mpro.

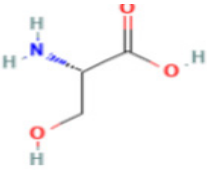
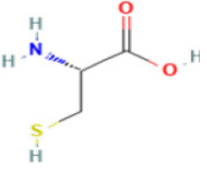
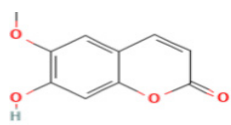
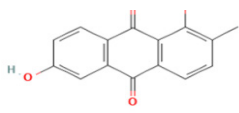
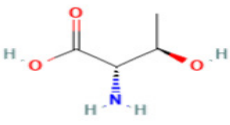
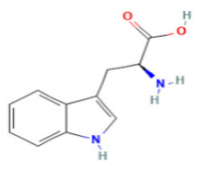
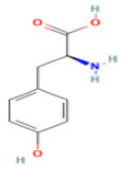
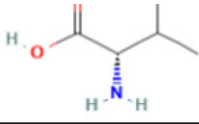
Tabel 2. Hasil *Molecular Docking* dari Senyawa Bioaktif *M. citrifolia*

No.	Senyawa	ΔG (kkal/mol)	KI (nM)	Residu Asam Amino	Struktur 2D
	Asam heksikarbamat (ligan alami)	-2,29	$20,85 \times 10^6$	GLY143A, MET165A, HIS41A	
	Ligan ritonavir (ligan pembanding)	-5,48	$95,89 \times 10^3$	GLY143A, MET165A, MET49A, MET49A, ASN142, HIS41A, THR26A	
1	2-Pentanon	-3,78	$1,69 \times 10^6$	GLN192A, THR190A	
2.	3-Metilbutanal	-3,65	$2,11 \times 10^6$	GLN192A, THR190A, GLN189A, MET49A	
3.	4-Epi-boreriagenin	-5,84	$52,37 \times 10^3$	GLY143A, HIS164A, CYS145A, GLU166, HIS172A, HIS163A	
4.	Alanin	-2,93	$7,15 \times 10^6$	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A	

5.	Alizarin	-6,65	13,38×10 ³	ARG188A, GLN192A, THR190A, GLU166A, GLN189A, MET165A, CYS145A	
6.	Arginin	-3,98	1,21×10 ⁶	PHE140A, GLY143A, CYS145A, SER144A	
7.	Asam aspartat	-2,96	6,76×10 ⁶	GLU166A, CYS145A, LEU141A, SER144A	
8.	Asam deasetilasperulosidat	-6,63	13,70×10 ³	GLN192A, ARG188A, GLN189A, GLU166A, HIS163A, ASN142A, GLY143A, MET165A, MET49A, HIS41A	
9.	Asam glutamat	-2,93	7,14×10 ⁶	CYS145A, SER144A, GLY143A, LEU141A ASN142A	
10.	Asam kaprilat	-3,90	1,38×10 ⁶	CYS145A, SER144A, GLY143A	
11.	Asam kaproat	-3,66	2,09×10 ⁶	GLY143A, SER144A, CYS145A	
12.	Asam glutamat	-2,93	7,14×10 ⁶	CYS145A, SER144A, GLY143A, LEU141A ASN142A	
13.	Asperulosid tetraasetat	-7,85	1,75×10 ³	GLU166A, SER144A, GLY143A, CYS145A, SER46A, HIS41A, HIS172A, ASN142A, MET49A, MET165A	
14.	Asam ursolat	-7,41	3,69×10 ³	THR26A, LEU27A, CYS145A, HIS41A, MET165A, MET49A	

15.	Beta-sitosterol	-9,01	249,79	THR190A, GLN192A, HIS41A, HIS163A, CYS145A, MET165A	
16.	Damnacantal	-6,74	11,51×10 ³	GLU166A, GLY143A, CYS145A, HIS41A, HIS163A	
17.	Etil kaproat	-4,13	932,78×10 ³	GLY143A, SER144A, CYS145A, HIS172A, HIS163A	
18.	Etil kaprilat	-4,34	664,35×10 ³	CYS145A, SER144A	
19.	Heksosa	-4,96	232,64×10 ³	GLU166A, GLY143A, LEU141A, SER144A, HIS163A, ASN142A, HIS172A	
20.	Histidin	-4,45	551×10 ³	HIS163A, SER144A, CYS145A, GLY143A, ASN142A	
21.	Isoleusin	-4,05	1,07×10 ⁶	SER144A, CYS145A	
22.	Kaempferol	-7,51	3,15×10 ³	GLU166A, HIS163A, SER144A, GLY143A, THR26A, CYS145A	
23.	Kuersetin	-7,79	1,94×10 ³	GLN189A, GLU166A, SER144A, GLY143A, LEU141A, ASN142A, MET165A, CYS145, HIS41A, MET49A	
24.	Leusin	-4,15	913,56×10 ³	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A, PHE140A, HIS163A, HIS172A	

25.	Lusidin	-6,70	12,32×10 ³	GLY143A, SER144A, GLU166A, CYS145A, HIS41A, HIS163A	
26.	Metionin	-3,69	1,97×10 ⁶	CYS145A, GLY143A, SER144A, ASN142A, HIS163A, HIS172A	
27.	Metil dekanolat	-4,15	902,33×10 ³	SER144A, ASN142A, PHE140A, GLU166A, LEU141A, MET165A, MET49A	
28.	Metil oktanoat	-4,71	353,67×10 ³	THR190A, GLN189A, GLU166A, MET165A, HIS164A, HIS41A	
29.	Morindon	-7,01	7,31×10 ³	GLN192A, THR190A, ARG188A, GLU166A, GLN189A, MET165A, CYS145A	
30.	Prolin	-4,04	1,09×10 ⁶	SER144A, CYS145A, ASN142A	
31.	Rubiadin	-6,95	7,98×10 ³	GLU166A, SER144A, GLY143A, CYS145A, HIS163A	
32.	Rutin	-9,86	59,71	GLU166A, HIS163A, SER144A, PHE140A, CYS145A, GLY143A, HIS41A, THR25A, CYS44A, MET165A, LEU27A	

33.	Serin	-3,27	$3,98 \times 10^6$	HIS163A, CYS145A, GLY143A, SER144A, LEU141A, MET165A	
34.	Sistein	-3,36	$3,46 \times 10^6$	GLY143A, CYS145A, SER144A, HIS163A, PHE140A, ASN142A, HIS172A	
35.	Skopoletin	-5,80	$55,72 \times 10^3$	GLN192A, THR190A, HIS41A, MET165A, MET49A	
36.	Soranjidiol	-7,74	$2,13 \times 10^3$	GLN192A, ARG188A, THR190A, GLU166A, MET165A, MET49A	
37.	Treonin	-3,64	$2,14 \times 10^6$	HIS163A, CYS145A, SER144A, ASN142A	
38.	Triptofan	-5,29	$133,47 \times 10^3$	ASN142A, GLY143A, CYS145A, SER144A, LEU141A	
39.	Tirosin	-4,55	460×10^3	HIS163A, CYS145A	
40.	Valin	-3,73	$1,83 \times 10^6$	GLY143A, CYS145A, SER144A, ASN142A	

3.3. Prediksi *Drug-Likeness*

Hasil prediksi *drug likeness* dari keseluruhan diperoleh hanya 12 senyawa uji yang memenuhi aturan *Lipinski's Rule of Five* (Tabel 3). Senyawa yang memenuhi aturan Lipinski merupakan senyawa yang ideal untuk dijadikan sediaan obat oral karena memiliki profil absorbs yang baik. Syarat senyawa yang lolos aturan Lipinski adalah memiliki berat molekul tidak lebih dari 500 Dalton, memiliki tidak lebih dari 10 gugus akseptor

hydrogen dan 5 donor ikatan hydrogen, serta memiliki nilai lipofilisitas (LogP) tidak lebih dari 5.20 Terdapat 12 dari 40 senyawa yang memenuhi aturan Lipinski. Kuersetin (ligan terbaik berdasarkan skrining farmakofor), memenuhi aturan ini, sedangkan rutin (ligan terbaik berdasarkan molecular docking) tidak memenuhi aturan ini. Namun, senyawa yang tidak lolos aturan Lipinski tetap bisa dijadikan obat dalam bentuk sediaan non-oral.

Tabel 3. Hasil Prediksi *Drug Likeness* dari Senyawa Bioaktif *M. citrifolia*

No.	Nama Senyawa	Berat Molekul (gr/mol)	Akseptor Ikatan Hidrogen	Donor Ikatan Hidrogen	Log P	Ket.
1.	2-Pentanon	86,13	1	0	0,9	
2.	3-Metilbutanal	86,13	1	0	1	
3.	4-Epi-boreriagenin	214,21	5	3	-1,5	
4.	Alanin	89,09	3	2	-3	
5.	Alizarin	240,21	4	3	3,2	
6.	Arginin	174,2	4	4	-4,2	
7.	Asam aspartat	133,1	5	3	-2,8	
8.	Asam deasetilasperulosidat	390,34	11	7	-3,8	
9.	Asam glutamat	147,13	5	3	-3,7	
10.	Asam kaprilat	144,21	2	1	3	
11.	Asam kaproat	116,16	2	1	1,9	
12.	Asam linoleat	280,4	2	1	6,8	
13.	Asam ursolat	456,7	3	2	7,3	
14.	Asperulosid tetraasetat	582,5	15	0	-0,7	
15.	Beta-sitosterol	414,7	1	1	9,3	
16.	Damnacantal	282,25	5	1	2,5	
17.	Etil kaprilat	172,26	2	0	3,5	
18.	Etil kaproat	144,21	2	0	2,4	
19.	Heksosa	180,16	6	5	-2,6	
20.	Histidin	155,15	4	3	-3,2	
21.	Isoleusin	131,17	3	2	-1,5	
22.	Kaempferol	286,24	6	4	1,9	
23.	Kuersetin	302,23	7	5	1,5	
24.	Leusin	131,17	3	2	-1,5	
25.	Lusidin	270,24	5	3	2,4	
26.	Metil dekanat	186,29	9	2	4,7	
27.	Metil oktanoat	158,24	2	0	3,6	
28.	Metionin	149,21	4	2	-1,9	
29.	Morindon	270,24	5	3	3,3	
30.	Prolin	112,13	3	2	-2,5	
31.	Rubiadin	254,24	4	2	3,1	
32.	Rutin	610,5	16	10	-1,3	
33.	Serin	105,09	4	3	-3,1	
34.	Sistein	121,16	4	3	-2,5	
35.	Skopoletin	192,17	4	1	1,5	
36.	Soranjidiol	254,24	4	2	3,1	
37.	Tirosin	181,19	4	3	-2,3	
38.	Treonin	119,12	4	3	-2,9	
39.	Triptofan	204,22	3	3	-1,1	
40.	Valin	117,15	3	2	-2,3	

Keterangan: Warna hijau = memenuhi syarat; Warna merah = tidak memenuhi syarat

3.4. Prediksi Farmakokinetika dan Toksisitas

Dari hasil prediksi profil farmakokinetika dan toksisitas dari seluruh senyawa, hanya terdapat 5 senyawa yang memenuhi syarat profil farmakokinetika dan toksisitas (Tabel 4, warna hijau), dan kelima senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas yang baik terhadap

Mpro berdasarkan skrining farmakofor maupun *molecular docking*. Maka dari itu, untuk senyawa-senyawa yang memang memiliki aktivitas yang baik perlu dilakukan modifikasi struktur untuk memperbaiki profil farmakokinetika ataupun mengurangi toksisitasnya.

Tabel 4. Hasil Prediksi Farmakokinetika dan Toksisitas dari Senyawa Bioaktif *M. citrifolia*

No.	Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksisitas	
		HIA (%)	Caco2 (nm. ^{Sec-1})	Plasma Protein Binding (%)	Crammer Rules	Benigni/Bossa Rulebase	Kroes TTC Decision Tree
1.	2-Pentanon	100 ^a	42,48 ^b	81,08 ^b	1	8,9	1
2.	3-Metilbutanal	100 ^a	24,73 ^b	81,71 ^b	1	1,9	2
3.	4-Epi-boreriagenin	68,08 ^b	20,30 ^b	2,47 ^b	3	8,9	1
4.	Alanin	71,40 ^a	15,34 ^b	86,94 ^b	1	8,9	1
5.	Alizarin	92,34 ^a	0,36 ^c	98,05 ^a	3	1,9	2
6.	Arginin	27,90 ^b	20,96 ^b	15,35 ^b	1	8,9	1
7.	Asam aspartate	35,26 ^b	8,82 ^b	56,14 ^b	1	8,9	1
8.	Asam deasetilasperulosidat	6,97 ^c	14,03 ^b	18,01 ^b	3	8,9	1
9.	Asam glutamat	37,17 ^b	13,81 ^b	0 ^b	1	8,9	1
10.	Asam kaprilat	93,72 ^a	1,22 ^c	100 ^a	1	8,9	1
11.	Asam kaproat	90,93 ^a	20,73 ^b	84,64 ^b	1	8,9	1
12.	Asam linoleat	98,37 ^a	28,08 ^b	100 ^a	1	8,9	1
13.	Asam ursolat	95,99 ^a	21,87 ^b	100 ^a	1	8,9	1
14.	Asperulosid tetraasetat	51,92 ^b	15,25 ^b	37,49 ^b	3	8,9	1
15.	Beta-sitosterol	100 ^a	52,37 ^b	100 ^a	3	8,9	1
16.	Damnacantal	96,02 ^a	14,25 ^b	88,94 ^b	3	1,9	2
17.	Etil kaprilat	100 ^a	43,82 ^b	100 ^a	1	8,9	1
18.	Etil kaproat	100 ^a	55,67 ^b	100 ^a	1	8,9	1
19.	Heksosa	22,36 ^b	2,57 ^c	7,31 ^b	1	8,9	1
20.	Histidin	59,66 ^b	18,35 ^b	0 ^b	1	2,8	1
21.	Isoleusin	77,40 ^a	20,42 ^b	0 ^b	1	8,9	1
22.	Kaempferol	79,44 ^a	9,58 ^b	89,61 ^b	3	8,9	1
23.	Kuersetin	63,49 ^b	3,41 ^c	93,24 ^a	3	2,9	1
24.	Leusin	77,40 ^a	20,42 ^b	0 ^b	1	8,9	1
25.	Lusidin	87,27 ^a	5,76 ^b	86,85 ^b	3	1,9	2
26.	Metil dekanat	100 ^a	38,23 ^b	100 ^a	1	8,9	1
27.	Metil oktanoat	100 ^a	29,64 ^b	100 ^a	1	8,9	1
28.	Metionin	76,28 ^a	20,60 ^b	0 ^b	1	8,9	1
29.	Morindon	90,42 ^a	20,89 ^b	99,58 ^a	3	1,9	2
30.	Prolin	78,32 ^a	20,39 ^b	83,38 ^b	1	8,9	1
31.	Rubiadin	92,59 ^a	16,33 ^b	96,48 ^a	3	1,9	2

32.	Rutin	2,86 ^c	28,89 ^b	43,89 ^b	3	2,8	1
33.	Serin	50,63 ^b	6,97 ^b	78,05 ^b	1	8,9	1
34.	Sistein	56,88 ^a	19,71 ^b	32,86 ^b	1	8,9	1
35.	Skopoletin	93,92 ^a	0,28 ^c	29,42 ^b	3	8,9	2
36.	Soranjidiol	93,74 ^a	21,11 ^b	100 ^a	3	2,9	2
37.	Tirosin	79,68 ^a	21,11 ^b	1,58 ^b	1	2,8	1
38.	Treonin	52,07 ^b	9,94 ^b	80,95 ^b	1	8,9	1
39.	Triptofan	85,32 ^a	0,25 ^c	29,78 ^b	1	8,9	1
40.	Valin	75,26 ^a	20,05 ^b	88,62 ^b	1	8,9	1

Keterangan :

% Human Intestinal Absorption (% HIA)²¹

(a) 70-100% well absorbed

(b) 20-70% moderately absorbed

(c) 0-20% poorly absorbed

In Vitro Caco-2 cell permeability (nm/sec)²¹

(a) >70 higher permeability

(b) 4-70 medium permeability

(c) <4 low permeability

Plasma protein binding (%)²¹

(a) >90 strongly bound

(b) < 90 weakly bound

Cramer rules²²

(1) Substances with sample chemical structures and fix which efficient modes of metabolism exist, suggesting a low order of oral toxicity

(2) Substances which possess structures that are less innocuous than class I substances, but do not contain structural features suggestive of toxicity like those substances in class III

(3) Substances with chemical structures that permit no strong initial presumption of safety or may even suggest significant toxicity or have reactive functional groups.

Benigni/Bossa Rulebase²³

(1) Structural Alert for genotoxic carcinogenicity

(2) Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity

(8) Negative for genotoxic carcinogenicity

(9) Negative for nongenotoxic carcinogenicity

Kroes TTC²⁴

(1) Substances would not be expected to be a safety concern

(2) Negligible risk (low probability of life-time cancer risk greater than 1 in 106).

4. Pembahasan

Pendekatan *in silico* pada senyawa-senyawa dalam mengkudu (*Morinda citrifolia*) telah dilakukan terhadap enzim *main protease* (Mpro) pada SARS-CoV-2. Tahapan yang dilakukan meliputi skrining farmakofor, *molecular docking*, prediksi *drug-likeness*, dan prediksi profil farmakokinetika serta toksisitas. Meskipun pendekatan ini cepat, murah, dan memiliki tingkat resiko yang rendah, kekurangan dari pendekatan ini adalah akurasi hasilnya masih cenderung lebih rendah dibandingkan pendekatan lain. Hasil dari pendekatan ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian dengan pendekatan lain yang lebih akurat dan memiliki tingkat resiko yang lebih tinggi, seperti *in vitro* dan *in vivo*, dalam penemuan obat COVID-19.

Skrining farmakofor merupakan metode pengembangan obat virtual *ligand-based* di mana penemuan senyawa potensial dilakukan dengan membandingkan dengan senyawa lain. Farmakofor sendiri didefinisikan sebagai susunan gugus dalam suatu senyawa yang dapat dikenali oleh suatu reseptor sehingga bertanggung jawab terhadap aktivitas senyawa tersebut.²⁵ Skrining farmakofor dilakukan dengan membandingkan kesamaan farmakofor antara senyawa uji dengan senyawa lain yang sudah diketahui aktif atau tidak aktif terhadap suatu reseptor, yang pada kasus ini merupakan reseptor HIV-1 protease yang memiliki kesamaan mekanisme dengan Mpro pada SARS-CoV-2.²⁶ Senyawa yang diuji dinilai aktivitasnya berdasarkan *pharmacophore*

fit score yang menyatakan kecocokkan geometrik struktur suatu senyawa dengan model farmakofor standar.¹³ Dari 40 senyawa, terdapat 13 senyawa yang memiliki kesamaan farmakofor dengan senyawa aktif di mana kuersetin merupakan senyawa yang paling aktif dengan nilai *fit score* sebesar 41,05.

Molecular docking, berbeda dengan skrining farmakofor merupakan metode pengembangan obat *structure-based* dengan penemuan senyawa potensial dilakukan melalui melihat kecocokan interaksi antara struktur senyawa tersebut dengan struktur reseptor.²⁷ Senyawa yang ditambahkan akan menjadi ligan dan berinteraksi dengan reseptor dengan mengalami perubahan energi bebas Gibbs. Semakin besar nilai perubahan energi bebas Gibbs, semakin kuat interaksi yang terjadi.²⁸ Senyawa tersebut juga akan berinteraksi dengan asam amino yang terdapat dalam reseptor. Akan tetapi, tidak semua interaksi asam amino akan menghasilkan aktivitas. Maka dari itu, perlu juga dibandingkan asam amino yang berinteraksi dengan asam amino kunci. Berdasarkan pertimbangan tersebut, senyawa yang paling baik aktivitasnya secara analisis *molecular docking* adalah rutin dengan nilai perubahan energi bebas Gibbs paling besar sebesar 9,86 dan mengikat dua residu asam amino kunci GLY143A dan MET165A.

Senyawa terbaik dari skrining farmakofor ternyata berbeda dari *molecular docking*. Akan tetapi, kedua senyawa tersebut, meskipun bukan yang terbaik, juga merupakan kandidat kuat dari pengujian lainnya. Rutin pada skrining farmakofor juga dikatakan memiliki kesamaan farmakofor dan menempati urutan ke-7 dengan nilai *fit score* 33,98. Sementara, meskipun tidak sebesar rutin, kuersetin dalam *molecular docking* juga memiliki nilai perubahan energi bebas Gibbs yang cukup untuk dikatakan poten yaitu 7,79 kkal/mol dan juga mengikat kedua asam amino kunci. Maka dibutuhkan pertimbangan lain untuk memutuskan senyawa yang lebih baik yaitu dari profil *drug-likeness* serta farmakokinetik dan toksisitas.

Hasil prediksi *drug-likeness* dengan aturan Lipinski menunjukkan bahwa

kuersetin cocok untuk dijadikan sediaan obat oral, sedangkan rutin tidak. Rutin merupakan kuersetin yang mengikat rutinosa yang berupa gugus gula, menjadikan senyawa rutin lebih besar dengan berat molekul 610,517 Dalton sehingga tidak memenuhi aturan Lipinski. Sementara itu, kuersetin yang tidak mengikat gugus gula hanya memiliki berat molekul 302,236 Dalton yang memenuhi aturan Lipinski. Maka dari itu, kuersetin merupakan kandidat yang lebih baik karena meskipun ada rute administrasi obat lain yang tidak membutuhkan absorpsi, pengobatan rute oral merupakan rute yang paling banyak digunakan hingga sekarang karena kepraktisannya.²⁹

Dari segi toksisitas, kuersetin dan rutin keduanya tidak memenuhi persyaratan. Hal ini didukung dengan data eksperimen praklinik yang dilakukan. Berdasarkan penelitian tersebut, dilaporkan bahwa baik kuersetin maupun rutin memiliki efek kerusakan DNA pada dosis 1250 mg/KgBB. Namun, dosis senyawa flavonoid, termasuk kuersetin dan rutin, yang sering digunakan untuk pengobatan adalah 100-500 mg/KgBB sehingga masih berada di bawah batas dosis yang menyebabkan kerusakan materi genetik.³⁰ Dari segi farmakokinetika, kuersetin sudah cukup baik kecuali dari segi permabilitasnya yang hanya kurang sedikit dari syarat. Sedangkan untuk rutin, hasil yang didapatkan sebanding dengan hasil *drug-likeness* yaitu memiliki profil absorpsi yang buruk. Berdasarkan pertimbangan tersebut, kuersetin dianggap sebagai kandidat obat yang lebih baik dibandingkan rutin.

5. Kesimpulan

Hasil prediksi aktivitas senyawa yang terkandung dalam mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Mpro sebagai anti SARS-CoV-2 melalui pendekatan *in silico* menunjukkan senyawa yang paling baik adalah kuersetin dengan *fit score* 41,05, perubahan energi bebas Gibbs 7,79 kkal/mol, dan mengikat residu asam amino penting yaitu GLY143 dan MET165, serta memiliki profil farmakokinetika dan toksisitas yang bisa diterima.

Daftar Pustaka

1. Kang S, Peng W, Zhu Y, Lu S, Zhou M, Lin W, et al. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020;55(5):105950.
2. Susilo A, Rumende CM, Pitoyo CW, Santoso WD, Yulianti M, Herikurniawan H, et al. Coronavirus Disease 2019: Tinjauan Literatur Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 2020;7(1):45.
3. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
4. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Dorsten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020;368(6489):409-12.
5. Westberg M, Su Y, Zou X, Huang P, Rustagi A, Garhyan J, et al. An orally bioavailable SARS-CoV-2 main protease inhibitor exhibits improved affinity and reduced sensitivity to mutations. *Science Translational Medicine*. 2024;16(738).
6. Li M, Zhang QS, Liu XL, Wang HL, Liu W. Adverse Events Associated with Nirmatrelvir/Ritonavir: A Pharmacovigilance Analysis Based on FAERS. *Pharmaceuticals*. 2022;15(12):1455.
7. Yotsuyanagi H, Ohmagari N, Doi Y. Efficacy and Safety of 5-Day Oral Ensitrelvir for Patients With Mild to Moderate COVID-19. *JAMA Network Open*. 2024;7(2): e2354991.
8. Karimi A, Majlesi M, Rafieian-Kopaei M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of Nephro pharmacology*. 2015;4(1): 27-30.
9. Kamata M, Wu RP, An DS, Saxe JP, Damoiseaux R, Phelps RE, et al. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthol as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;348(3): 1101-6.
10. Kharaeva Z, Shokarova A, Shomakhova Z, Ibragimova G, Trakhtman P, Trakhtman I, et al. Fermented *Carica papaya* and *Morinda citrifolia* as Perspective Food Supplements for the Treatment of Post-COVID Symptoms: Randomized Placebo-Controlled Clinical Laboratory Study. *Nutrients*. 2022;14(11): 2203.
11. Shaker B, Ahmad S, Lee J, Jung C, Na D. In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*. 2021;137: 104851.
12. Amin S, Utami F, Maulidya SAI. Virtual Screening of Flavonoid Compounds as A Main Protease Inhibitor for Anti-Sars-Cov-2 Candidates. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2022;9(3):198-209.
13. Mótýán JA, Mahdi M, Hoffka G, Tózsér J. Potential Resistance of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) against Protease Inhibitors: Lessons Learned from HIV-1 Protease. *International Journal of Molecular Science*. 2022;23(7): 3507.
14. Zhou Y, Di B, Niu MM. Structure-Based Pharmacophore Design and Virtual Screening for Novel Tubulin Inhibitors with Potential Anticancer Activity. *Molecules*. 2019;24(17): 3181.
15. Opo FADM, Alkarim S, Alrefaei GI, et al. Pharmacophore-Model-Based Virtual-Screening Approaches Identified Novel Natural Molecular Candidates for Treating Human Neuroblastoma. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022;44(10): 4838-58.
16. Nursanti O, Wardani I, Hadisoebroto G. Validasi Penambatan Molekuler (Docking) (*Zingiber officinale*) dan (*Cymbopogon citratus*) Sebagai Ligan Aktif Reseptor Ppar γ . *Jurnal Farmasi Higea*. 2022;14(1): 79.
17. Luo C, Rivkin A, Zhou J, Sandoval JP, Kurihara L, Lucero J, et al. Robust single-cell DNA methylome profiling with snmC-seq2. *Nature Communication*. 2018;9(1):3824.
18. Ortiz CLD, Completo GC, Nacario

- RC, Nellas RB. Potential Inhibitors of Galactofuranosyltransferase 2 (GltT2): Molecular Docking, 3D-QSAR, and In Silico ADMETox Studies. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17096.
19. Jin Z, Zhao Y, Sun Y, et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2020;27(6): 529-32.
 20. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drugs Delivery Review*. 2001;46(1-3):3-26.
 21. Izzaturahmi AS, Pauziah ASU, Virliana A, Sitinjak GML, Ramadhiany ZZ, Elaine AA, et al. In Silico Study of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) on VEGFR-2 Receptors in Breast Cancer. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*. 2023;3(3):137-153.
 22. Cramer GM, Ford RA, Hall RL. Estimation of toxic hazard—A decision tree approach. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1976;16(3): 255-76.
 23. Benigni R, Bossa C, Jeliaskova N, Netzeva T, and Worth A. The Benigni/Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity—a module of Toxtree. *JRC scientific and technical reports 1*. 2008;(63): 239.
 24. Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, et al. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42(1):65-83.
 25. Widyasari AD, Nur Ramadhan LOA, Dewi C. Pemodelan Farmakofor dan Skrining Virtual dari Database Senyawa Bahan Alam Sebagai Inhibitor Sars-CoV-2 RNA-dependent RNA Polimerase. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*. 2022;1(6):247-57.
 26. Lestari NA, Isrul M, Ramadhan DSF, Fatahu. Skrining Virtual Berbasis Farmakofor Dari Database Bahan Alam Sebagai Inhibitor Alosterik Mutan T790M/C797 EGFR Untuk Penemuan Obat Kanker Paru. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*. 2024;3(3):168-86.
 27. Li Q, Shah S. Structure-Based Virtual Screening. *Methods in Molecular Biology*. 2017:111-24.
 28. Pantsar T, Poso A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules*. 2018;23(8): 1899.
 29. Alqahtani MS, Kazi M, Alsenaidy MA, Ahmad MZ. Advances in Oral Drug Delivery. *Frontiers of Pharmacology*. 2021;12: 618411.
 30. da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Marroni NP, Gallego JG, et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40(7):941-947.