



Evaluasi Komprehensif Drug-Likeness, Profil ADMET, dan Potensi Bioavailabilitas Dua Polimetoksiflavin Citrus Menggunakan Pendekatan *In Silico*

Dani Darianudin¹, Anjas Wilapangga², Errol Rakhmad Noordam³, Apriyani Pramudiyawati⁴, Desi Eka Putri⁵

¹Farmasi, Universitas Ibnu Chaldun

²Farmasi, Universitas Ibnu Chaldun

³Farmasi, Universitas Medika Suherman

⁴Akademi Farmasi Persada

⁵Akademi Farmasi Persada

Correspondent Email: anjas@stikesbch.ac.id

Abstrak

Polimetoksiflavin (PMFs) merupakan kelompok flavonoid khas genus *Citrus* yang diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologis, namun informasi mengenai karakteristik drug-likeness, bioavailabilitas, dan profil ADMET kedua turunannya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi secara komprehensif sifat fisikokimia, drug-likeness, bioavailabilitas oral, profil ADME, dan toksisitas dari 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone serta 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone menggunakan pendekatan *in silico*. Analisis dilakukan melalui integrasi platform SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II berdasarkan struktur Canonical SMILES yang diperoleh dari PubChem. Hasil menunjukkan bahwa kedua senyawa memenuhi seluruh kriteria utama drug-likeness (Lipinski, Ghose, Veber, Egan, dan Muegge), memiliki bioavailability score sebesar 0,55, absorpsi usus yang sangat tinggi (>95%), serta bukan substrat P-glycoprotein. Kedua senyawa juga diprediksi memiliki permeabilitas membran yang baik, namun penetrasi terhadap blood-brain barrier rendah sehingga lebih sesuai dikembangkan untuk target perifer. Prediksi toksisitas menunjukkan toksisitas akut yang rendah (LD50 5000 mg/kg; Toxicity Class 5) serta tidak memiliki potensi kardiotoksitas melalui inhibisi hERG, meskipun masih diperlukan validasi terhadap potensi hepatotoksitas, imunotoksitas, dan mutagenisitas. Dibandingkan hexamethoxyflavone, heptamethoxyflavone menunjukkan keseimbangan profil fisikokimia, farmakokinetik, dan keamanan yang sedikit lebih baik. Secara keseluruhan, kedua polimetoksiflavin memiliki karakteristik yang mendukung pengembangan sebagai kandidat obat oral berbasis bahan alam, dengan heptamethoxyflavone direkomendasikan sebagai lead compound untuk penelitian lanjutan melalui molecular docking, molecular dynamics, dan validasi biologis.

Kata kunci: Polymethoxyflavone, SwissADME, pkCSM, ProTox-II, ADMET, drug-likeness, *in silico*.

Abstract

Polymethoxyflavones (PMFs) are citrus-derived flavonoids with diverse pharmacological activities; however, comprehensive information regarding their drug-likeness, oral bioavailability, and ADMET characteristics remains limited. This study aimed to comprehensively evaluate the physicochemical properties, drug-likeness, oral bioavailability, ADME profile, and toxicity of 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone and 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone using an integrated *in silico* approach. Canonical SMILES obtained from PubChem were analyzed using SwissADME,

pkCSM, and ProTox-II. Both compounds satisfied all major drug-likeness criteria, including Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge rules, with a bioavailability score of 0.55. They exhibited excellent predicted intestinal absorption (>95%), high membrane permeability, and were not predicted as P-glycoprotein substrates. Both compounds showed limited blood–brain barrier penetration, indicating greater suitability for peripheral therapeutic applications. Toxicity prediction suggested low acute oral toxicity (LD50 = 5000 mg/kg; Toxicity Class 5) and low cardiotoxicity risk due to the absence of hERG inhibition, although further experimental validation is required for hepatotoxicity, immunotoxicity, and mutagenicity. Overall, 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone demonstrated a slightly more balanced pharmacokinetic and safety profile than 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone. These findings indicate that both polymethoxyflavones are promising natural-product-derived oral drug candidates, with heptamethoxyflavone representing the more promising lead compound for subsequent molecular docking, molecular dynamics simulations, and biological validation.

Keywords: polymethoxyflavone; SwissADME; pkCSM; ProTox-II; ADMET; drug-likeness; *in silico*

Accepted Date: 15 July 2026

Publish Date: 30 July 2026

Pendahuluan

Pengembangan kandidat obat baru tidak hanya bergantung pada aktivitas biologis suatu senyawa, tetapi juga pada karakteristik farmakokinetik dan profil keamanannya. Diperkirakan lebih dari 90% kandidat obat gagal mencapai tahap uji klinis karena memiliki sifat Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity (ADMET) yang tidak memadai, meskipun menunjukkan aktivitas biologis yang menjanjikan pada tahap awal penelitian. Oleh karena itu, evaluasi parameter ADMET sejak fase awal penemuan obat menjadi strategi penting untuk mengurangi tingkat kegagalan pengembangan obat sekaligus menekan biaya dan waktu penelitian. Dalam beberapa dekade terakhir, senyawa bahan alam tetap menjadi salah satu sumber utama dalam penemuan obat modern. Berbagai metabolit sekunder tumbuhan, termasuk alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, dan steroid, telah dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis yang luas, seperti antiinflamasi, antioksidan, antimikroba, antikanker, antivirus, dan antidiabetes. Di antara berbagai kelompok metabolit tersebut, flavonoid menjadi salah satu kelompok yang paling banyak diteliti karena memiliki keragaman struktur kimia yang berpengaruh langsung terhadap aktivitas biologis dan karakteristik farmakokinetiknya[1]. Polimetoksiflavin (polymethoxyflavones/PMFs) merupakan subkelompok flavonoid yang terutama ditemukan pada berbagai spesies Citrus. Dibandingkan flavonoid hidroksilasi, PMFs memiliki jumlah gugus metoksi yang lebih banyak sehingga menunjukkan peningkatan lipofilisitas, stabilitas metabolik, serta kemampuan penetrasi membran biologis. Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa PMFs memiliki aktivitas antiinflamasi, antikanker, antioksidan, neuroprotektif, antidiabetes, dan kardioprotektif melalui modulasi berbagai jalur molekuler. Karakteristik tersebut menjadikan PMFs sebagai kandidat menarik dalam pengembangan obat berbasis bahan alam. Di antara berbagai PMFs, 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin) merupakan dua senyawa yang memiliki struktur kimia sangat mirip, tetapi berbeda pada jumlah gugus metoksi. Perbedaan kecil pada struktur kimia tersebut diperkirakan dapat memengaruhi sifat fisikokimia, lipofilisitas, kelarutan, permeabilitas membran, interaksi dengan protein transporter maupun enzim metabolisme, sehingga berpotensi menghasilkan profil farmakokinetik dan toksisitas yang berbeda. Namun demikian, hubungan antara variasi

struktur tersebut dengan karakteristik ADMET kedua senyawa masih belum dipahami secara komprehensif. Perkembangan pendekatan computer-aided drug discovery telah menjadikan metode *in silico* sebagai salah satu tahapan penting dalam proses penyaringan awal kandidat obat. Berbagai platform komputasi seperti SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II memungkinkan prediksi sifat fisikokimia, drug-likeness, bioavailabilitas oral, parameter farmakokinetik, serta potensi toksisitas secara cepat dan efisien hanya berdasarkan struktur molekul [2], [3]. Integrasi beberapa platform prediksi tersebut memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai kelayakan suatu senyawa sebelum dilakukan validasi melalui pendekatan eksperimental *in vitro* maupun *in vivo*. Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan aktivitas biologis polimetoksiflavin, sebagian besar masih berfokus pada evaluasi farmakologinya, sedangkan kajian komprehensif yang mengintegrasikan analisis sifat fisikokimia, drug-likeness, profil ADMET, dan toksisitas secara komparatif antara 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone masih sangat terbatas. Padahal, informasi tersebut sangat penting untuk memahami pengaruh substitusi gugus metoksi terhadap karakteristik farmakokinetik serta potensi pengembangan kedua senyawa sebagai kandidat obat oral. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk melakukan evaluasi komprehensif terhadap sifat fisikokimia, drug-likeness, bioavailabilitas oral, profil ADMET, serta toksisitas kedua polimetoksiflavin menggunakan pendekatan terintegrasi melalui SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II. Selain membandingkan karakteristik farmakokinetik kedua senyawa, penelitian ini juga bertujuan mengidentifikasi pengaruh variasi jumlah gugus metoksi terhadap kelayakan kedua senyawa sebagai kandidat obat berbasis bahan alam. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan lebih lanjut melalui studi molecular docking, molecular dynamics simulation, serta validasi biologis secara *in vitro* dan *in vivo* [4].

Metode Penelitian

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian komputasional (computational study) dengan pendekatan *in silico* yang bertujuan mengevaluasi karakteristik fisikokimia, drug-likeness, bioavailabilitas oral, profil farmakokinetik (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion/ADME), serta toksisitas dua senyawa polimetoksiflavin, yaitu 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin). Seluruh analisis dilakukan menggunakan pendekatan prediksi berbasis struktur molekul melalui integrasi tiga platform komputasi, yaitu SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II, yang merupakan perangkat lunak *in silico* yang banyak digunakan dalam proses penyaringan awal kandidat obat.

Pengambilan Data Senyawa

Struktur kimia kedua senyawa diperoleh dari basis data kimia PubChem dalam format Canonical SMILES. Sebelum dilakukan analisis, identitas masing-masing senyawa diverifikasi berdasarkan nama kimia, rumus molekul, berat molekul, InChI, dan InChIKey untuk memastikan konsistensi struktur yang digunakan pada seluruh platform prediksi.

Evaluasi Sifat Fisikokimia dan Drug-Likeness

Evaluasi sifat fisikokimia dan drug-likeness dilakukan menggunakan platform SwissADME. Struktur molekul dalam format SMILES digunakan sebagai data masukan (input) untuk memperoleh prediksi berbagai karakteristik molekul yang berkaitan dengan pengembangan obat. Parameter yang dievaluasi meliputi karakteristik

fisikokimia, lipofilisitas, kelarutan, bioavailabilitas oral, permeabilitas membran, permeabilitas sawar darah otak (blood–brain barrier), interaksi dengan transporter P-glycoprotein, prediksi inhibisi enzim sitokrom P450, serta berbagai indikator drug-likeness, termasuk Lipinski Rule of Five, Ghose, Veber, Egan, Muegge, Bioavailability Radar, BOILED-Egg, PAINS, Brenk Alert, Lead-likeness, dan Synthetic Accessibility. Seluruh analisis dilakukan menggunakan parameter bawaan (default settings) dari SwissADME [3].

Prediksi Profil Farmakokinetik

Prediksi profil farmakokinetik dilakukan menggunakan platform pkCSM berbasis pendekatan graph-based signatures. Struktur SMILES masing-masing senyawa dimasukkan ke dalam server pkCSM untuk memprediksi parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADMET). Parameter yang dianalisis meliputi kelarutan dalam air, permeabilitas Caco-2, absorpsi usus manusia, permeabilitas kulit, interaksi dengan P-glycoprotein, volume distribusi (steady-state volume of distribution), fraksi bebas plasma, permeabilitas blood–brain barrier, permeabilitas sistem saraf pusat, interaksi dengan enzim CYP450, total clearance, transporter OCT2 ginjal, serta berbagai parameter toksisitas seperti AMES mutagenicity, hERG inhibition, hepatotoksitas, toksisitas akut oral, toksisitas kronis, sensitivitas kulit, dan toksisitas terhadap organisme akuatik.

Prediksi Toksisitas

Evaluasi toksisitas dilakukan menggunakan platform ProTox-II. Prediksi dilakukan berdasarkan pendekatan machine learning yang menghubungkan struktur kimia dengan data toksisitas eksperimental yang telah tersedia. Parameter yang dianalisis meliputi nilai LD₅₀, kelas toksisitas akut, hepatotoksitas, karsinogenisitas, mutagenisitas, imunotoksitas, sitotoksitas, toksisitas organ, serta prediksi target toksik potensial. Seluruh analisis dilakukan menggunakan parameter standar yang tersedia pada platform ProTox-II.

Analisis dan Interpretasi

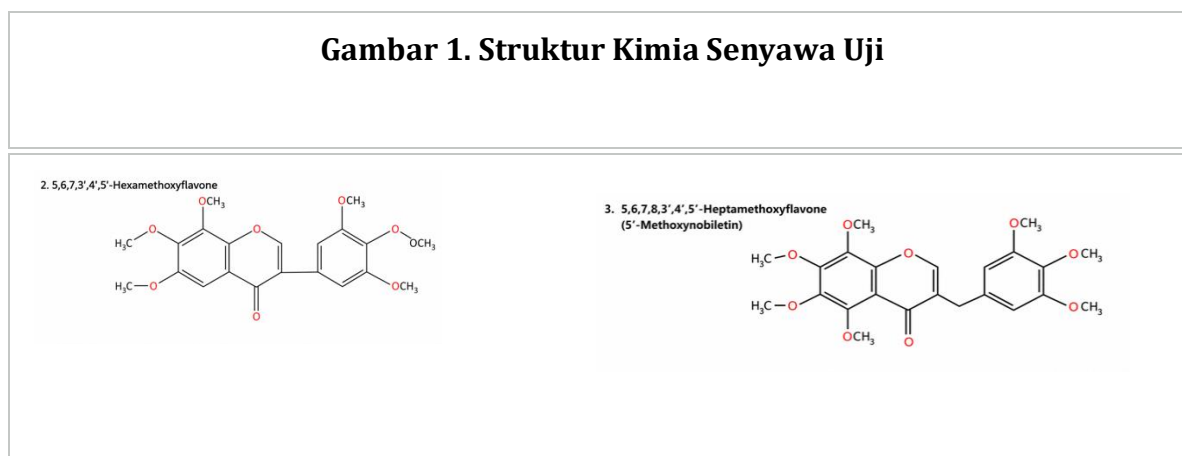
Data Seluruh hasil prediksi dari SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II dianalisis secara komparatif untuk mengidentifikasi perbedaan karakteristik kedua senyawa. Interpretasi dilakukan berdasarkan pedoman masing-masing platform serta literatur terkini mengenai evaluasi ADMET kandidat obat. Penilaian difokuskan pada hubungan antara struktur molekul dengan sifat fisikokimia, permeabilitas membran, bioavailabilitas oral, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas. Selain itu, dilakukan analisis hubungan struktur–aktivitas (structure–activity relationship, SAR) secara deskriptif untuk mengevaluasi pengaruh penambahan satu gugus metoksi terhadap perubahan sifat fisikokimia, drug-likeness, profil farmakokinetik, dan toksisitas kedua senyawa. Hasil dari ketiga platform kemudian diintegrasikan untuk menentukan senyawa yang memiliki prospek lebih baik sebagai kandidat obat oral.

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Stuktural dan Fisikokimia Senyawa Bioaktif

Eksplorasi senyawa alam sebagai kandidat obat oral modern sangat bergantung pada karakteristik struktural yang menentukan interaksi termodinamika dengan target

biologis. Pada penelitian ini, dua senyawa golongan *polymethoxyflavones* (PMFs), yaitu 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin), dievaluasi secara komputasional. Struktur kimia molekul diilustrasikan pada **Gambar 1**.



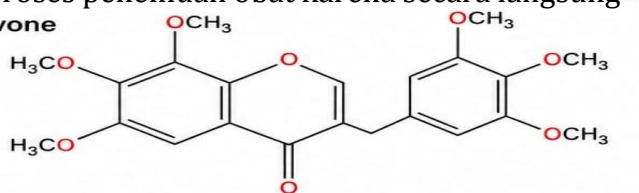
Karakteristik dasar dan deskriptif topologis dari kedua senyawa disajikan secara integratif pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Parameter Identitas Molekuler dan Sifat Fisikokimia (SwissADME) Analisis Mekanistik Sifat Fisikokimia:

Parameter	5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Kriteria Drug-Likeness
Molecular Formula	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	–
Molecular Weight (g/mol)	402.39	432.42	≤ 500
Heavy Atoms	29	31	–
Rotatable Bonds	7	8	≤ 10
Hydrogen Bond Acceptors (HBA)	8	9	≤ 10
Hydrogen Bond Donors (HBD)	0	0	≤ 5
Topological Polar Surface Area (TPSA, Å ²)	85.59	94.82	≤ 140
Fraction Csp ³	0.29	0.32	–
Molar Refractivity	106.87	113.36	40–130

Karakteristik fisikokimia merupakan salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan suatu molekul dalam proses penemuan obat karena secara langsung

2. 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone



memengaruhi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, serta aktivitas biologis suatu senyawa. Berdasarkan hasil prediksi SwissADME (Tabel 1), kedua polimetoksiflavin, yaitu 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin), menunjukkan karakteristik fisikokimia yang memenuhi sebagian besar kriteria kandidat obat oral.

Berat molekul kedua senyawa masing-masing sebesar 402,39 g/mol dan 432,42 g/mol, masih berada di bawah batas maksimum 500 Da sesuai dengan *Lipinski's Rule of Five*. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ukuran molekul kedua senyawa diperkirakan tidak menjadi hambatan terhadap difusi pasif melalui membran biologis. Meskipun heptamethoxyflavone memiliki berat molekul yang lebih tinggi akibat penambahan satu gugus metoksi, peningkatan tersebut masih berada dalam kisaran yang mendukung pengembangan sebagai kandidat obat oral.

Selain ukuran molekul, polaritas merupakan parameter penting yang memengaruhi kemampuan suatu senyawa untuk melewati membran biologis. Nilai TPSA sebesar 85,59 Å² pada hexamethoxyflavone dan 94,82 Å² pada heptamethoxyflavone masih berada jauh di bawah batas 140 Å² yang direkomendasikan oleh Veber. Hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki keseimbangan antara sifat hidrofilik dan lipofilik yang mendukung proses absorpsi melalui saluran gastrointestinal. Peningkatan TPSA pada heptamethoxyflavone menunjukkan bahwa penambahan gugus metoksi meningkatkan luas permukaan polar molekul, tetapi tidak sampai menghambat permeabilitas membran. Fleksibilitas molekul juga berperan penting dalam proses pengikatan dengan target biologis. Kedua senyawa memiliki jumlah rotatable bonds masing-masing sebanyak 7 dan 8, yang masih berada di bawah batas maksimum 10. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kedua molekul memiliki fleksibilitas konformasi yang cukup untuk beradaptasi selama proses interaksi dengan protein target tanpa kehilangan stabilitas struktur. Fleksibilitas yang moderat sering dikaitkan dengan peningkatan afinitas pengikatan karena memungkinkan molekul menyesuaikan orientasinya di dalam kantong aktif protein.

Kemampuan membentuk ikatan hidrogen juga merupakan faktor penting yang menentukan afinitas molekul terhadap reseptor biologis. Kedua senyawa memiliki jumlah Hydrogen Bond Acceptors (HBA) masing-masing sebesar 8 dan 9, sedangkan Hydrogen Bond Donors (HBD) bernilai 0. Nilai tersebut masih memenuhi kriteria Lipinski, menunjukkan bahwa kedua molekul tetap mampu berinteraksi dengan biomolekul melalui atom akseptor ikatan hidrogen. Tidak adanya donor ikatan hidrogen mencerminkan dominasi gugus metoksi dalam struktur kedua senyawa, yang sekaligus berkontribusi terhadap peningkatan lipofilisitas dibandingkan flavonoid hidroksilasi.

Parameter Fraction Csp³ menunjukkan nilai 0,29 pada hexamethoxyflavone dan 0,32 pada heptamethoxyflavone. Peningkatan nilai ini mengindikasikan bahwa penambahan satu gugus metoksi sedikit meningkatkan kompleksitas tiga dimensi molekul. Struktur tiga dimensi yang lebih kompleks sering dikaitkan dengan peningkatan selektivitas terhadap target biologis, meskipun pada kedua senyawa peningkatan tersebut relatif kecil sehingga karakter aromatik flavonoid masih tetap mendominasi.

Sementara itu, nilai Molar Refractivity sebesar 106,87 dan 113,36 masih berada dalam kisaran optimal (40–130), menunjukkan bahwa volume molekul dan kemampuan polarisasi elektron kedua senyawa sesuai dengan karakteristik kandidat obat. Parameter ini berkaitan dengan kemampuan molekul melakukan interaksi hidrofobik dan gaya van der Waals terhadap protein target, sehingga berpotensi mendukung pembentukan kompleks ligan–protein yang stabil.

Secara komparatif, penambahan satu gugus metoksi pada heptamethoxyflavone menyebabkan peningkatan berat molekul, jumlah atom berat, TPSA, jumlah HBA, nilai Fraction Csp³, dan molar refractivity dibandingkan hexamethoxyflavone. Meskipun demikian, seluruh parameter tersebut masih berada dalam rentang yang direkomendasikan untuk kandidat obat oral. Hasil ini menunjukkan bahwa modifikasi struktur melalui substitusi gugus metoksi meningkatkan kompleksitas molekul tanpa mengorbankan karakteristik fisikokimia yang diperlukan untuk absorpsi dan permeabilitas.

Secara keseluruhan, kedua senyawa menunjukkan profil fisikokimia yang sangat baik sebagai kandidat obat berbasis bahan alam. Kombinasi ukuran molekul yang sesuai, polaritas yang moderat, fleksibilitas struktur yang memadai, serta kapasitas pembentukan ikatan hidrogen yang memenuhi kriteria menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavin memiliki potensi tinggi untuk dikembangkan lebih lanjut. Berdasarkan keseluruhan parameter fisikokimia, 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone memiliki sedikit keunggulan pada aspek ukuran molekul dan polaritas yang lebih rendah sehingga diperkirakan memiliki permeabilitas membran yang lebih baik, sedangkan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone menawarkan kompleksitas struktur yang lebih tinggi yang berpotensi meningkatkan selektivitas interaksi terhadap target biologis. Perbedaan ini menunjukkan bahwa penambahan satu gugus metoksi menghasilkan perubahan sifat fisikokimia yang terukur, namun tetap mempertahankan karakteristik utama yang dibutuhkan sebagai kandidat obat oral [5].

3.2. Profil Lipofilisitas dan Kelarutan Intrinsic

Lipofilisitas dan kelarutan air merupakan dua parameter krusial yang saling bertolak belakang namun menentukan bioavailabilitas oral (*extended rule of two*). Data komparatif berbagai model algoritma prediksi disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Comparative lipophilicity and aqueous solubility profiles of polymethoxyflavones predicted by SwissADME and pkCSM

Parameter	5,6,7,3',4',5'- Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'- Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Recommended Range / Interpretation
iLOGP	3.00	3.08	Moderate lipophilicity
XLOGP3	2.22	2.19	0–5 (Lipinski)
WLOGP	3.51	3.52	Moderate lipophilicity
MLOGP	0.34	0.04	<4.15
Consensus LogP (LogPo/w)	2.24	2.18	Optimal balance between

			permeability and solubility
ESOL LogS	-3.68 (Moderately soluble)	-3.75 (Moderately soluble)	LogS > -4 preferred
Ali LogS	-3.65 (Moderately soluble)	-3.81 (Moderately soluble)	Moderate aqueous solubility
pkCSM Water Solubility (LogS)	-4.85	-4.54	Lower values indicate lower intrinsic solubility

Lipofilisitas merupakan salah satu determinan utama dalam pengembangan kandidat obat karena memengaruhi permeabilitas membran, distribusi jaringan, dan bioavailabilitas oral. Berdasarkan hasil prediksi SwissADME (Tabel 2), kedua polimetoksiflavin menunjukkan nilai Consensus LogP sebesar 2,24 untuk 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 2,18 untuk 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone. Nilai tersebut berada dalam kisaran yang secara luas dianggap optimal bagi kandidat obat oral karena mencerminkan keseimbangan antara hidrofilitas dan lipofilisitas. Molekul dengan nilai LogP sekitar 1–3 umumnya memiliki kemampuan yang baik untuk berdifusi secara pasif melalui membran fosfolipid tanpa mengalami akumulasi berlebihan pada jaringan lemak ataupun kehilangan kemampuan untuk berinteraksi dengan lingkungan berair di saluran gastrointestinal. Konsistensi nilai yang diperoleh dari berbagai algoritma prediksi, termasuk iLOGP, XLOGP3, dan WLOGP, menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki karakter lipofilik yang stabil meskipun dihitung menggunakan pendekatan matematis yang berbeda. Perbedaan kecil antara hexamethoxyflavone dan heptamethoxyflavone mengindikasikan bahwa penambahan satu gugus metoksi tidak memberikan perubahan yang signifikan terhadap koefisien partisi oktanol/air. Dengan demikian, substitusi metoksi tambahan lebih berpengaruh terhadap parameter lain seperti ukuran molekul dan polaritas dibandingkan terhadap lipofilisitas keseluruhan. Sebaliknya, evaluasi kelarutan menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki keterbatasan pada fase berair. Nilai ESOL LogS dan Ali LogS mengklasifikasikan kedua senyawa sebagai moderately soluble, sedangkan prediksi menggunakan pkCSM menghasilkan nilai LogS yang lebih rendah (-4,85 dan -4,54). Perbedaan tersebut mencerminkan variasi algoritma prediksi yang digunakan oleh masing-masing platform, namun secara umum seluruh hasil mengarah pada kesimpulan bahwa polimetoksiflavin memiliki kelarutan intrinsik yang relatif rendah. Penurunan kelarutan tersebut dapat dijelaskan melalui karakteristik struktur kimia kedua molekul. Dominasi cincin aromatik dan tingginya jumlah gugus metoksi meningkatkan luas permukaan hidrofobik sehingga mengurangi kemampuan molekul membentuk jaringan ikatan hidrogen dengan air. Meskipun atom oksigen pada gugus metoksi berperan sebagai hydrogen bond acceptor, gugus tersebut tidak berfungsi sebagai hydrogen bond donor, sehingga interaksi dengan pelarut berair menjadi lebih terbatas. Konsekuensinya, peningkatan substitusi metoksi menghasilkan peningkatan sifat hidrofobik yang berpotensi menurunkan kelarutan termodinamik senyawa. Menariknya, keterbatasan kelarutan tersebut tidak diikuti oleh penurunan kemampuan absorpsi oral. Hasil SwissADME menunjukkan bahwa kedua senyawa tetap diprediksi memiliki gastrointestinal absorption yang tinggi, menunjukkan bahwa permeabilitas membran kemungkinan menjadi faktor dominan dibandingkan proses disolusi. Kondisi ini merupakan karakteristik yang umum ditemukan pada kelompok Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class II, yaitu senyawa dengan permeabilitas tinggi tetapi

kelarutan rendah. Pada kelompok senyawa seperti ini, bioavailabilitas oral lebih banyak dipengaruhi oleh kecepatan disolusi daripada kemampuan molekul menembus membran biologis. Dari perspektif pengembangan formulasi farmasi, temuan ini memiliki implikasi yang penting. Walaupun kedua polimetoksiflavin telah memenuhi sebagian besar parameter drug-likeness, keterbatasan kelarutan diperkirakan menjadi faktor pembatas utama terhadap ketersediaan hayati oral. Oleh karena itu, strategi peningkatan kelarutan seperti Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS), Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS), kompleks inklusi menggunakan cyclodextrin, solid dispersion, maupun formulasi nanopartikel dapat dipertimbangkan untuk meningkatkan laju disolusi dan absorpsi in vivo. Pendekatan tersebut telah banyak diterapkan untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa flavonoid yang memiliki karakteristik fisikokimia serupa. Secara keseluruhan, hasil analisis menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavin memiliki keseimbangan lipofilisitas yang sangat baik untuk kandidat obat oral, namun masih menghadapi tantangan pada aspek kelarutan air. Dibandingkan heptamethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone menunjukkan nilai kelarutan yang sedikit lebih baik, sedangkan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone mempertahankan lipofilisitas yang hampir identik meskipun memiliki satu gugus metoksi tambahan. Temuan ini menunjukkan bahwa penambahan gugus metoksi lebih banyak memengaruhi karakteristik kelarutan dibandingkan lipofilisitas, sehingga optimasi formulasi menjadi langkah yang lebih rasional dibandingkan modifikasi struktur untuk meningkatkan bioavailabilitas kedua senyawa [2], [3], [6].

3.3. Evaluasi Kepatuhan Kriteria Drug-Likeness

Untuk meminimalkan *attrition rate* pada fase klinis, kelayakan struktur molekul dievaluasi menggunakan lima filter komersial utama dunia farmasi, disajikan dalam **Tabel 3**.

Tabel 3. Penapisan Kelayakan Obat (*Drug-Likeness Filters*)

Drug-likeness Filter	5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Interpretation
Lipinski Rule of Five	✓ Pass (0 violation)	✓ Pass (0 violation)	Suitable for passive oral absorption
Ghose Filter	✓ Pass	✓ Pass	Physicochemical properties within acceptable range
Veber Rule	✓ Pass	✓ Pass	Favorable membrane permeability and oral bioavailability
Egan Rule	✓ Pass	✓ Pass	High probability of intestinal absorption
Muegge Rule	✓ Pass	✓ Pass	Drug-like molecular

			characteristics fulfilled
Bioavailability Score	0.55	0.55	Moderate probability of oral bioavailability
PAINS Alerts	None	None	No assay-interfering substructures detected
Synthetic Accessibility	3.83	4.05	Relatively easy chemical synthesis

Keberhasilan suatu molekul sebagai kandidat obat tidak hanya ditentukan oleh aktivitas biologisnya, tetapi juga oleh kemampuannya memenuhi karakteristik fisikokimia yang mendukung absorpsi, distribusi, serta bioavailabilitas oral. Oleh karena itu, evaluasi *drug-likeness* merupakan tahapan penting dalam proses penyaringan awal (*early-stage drug discovery*) untuk mengidentifikasi molekul yang memiliki peluang lebih besar mencapai keberhasilan pada tahap pengembangan selanjutnya.

Berdasarkan hasil prediksi SwissADME (Tabel 3), kedua polimetoksiflavon memenuhi seluruh aturan *drug-likeness* utama, termasuk Lipinski Rule of Five, Ghose Filter, Veber Rule, Egan Rule, dan Muegge Rule. Konsistensi hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki keseimbangan yang baik antara ukuran molekul, polaritas, lipofilisitas, fleksibilitas struktur, serta kemampuan membentuk ikatan hidrogen. Secara keseluruhan, parameter tersebut merupakan karakteristik yang umum ditemukan pada molekul dengan potensi absorpsi oral yang tinggi.

Pemenuhan Lipinski Rule of Five tanpa adanya pelanggaran menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki berat molekul, jumlah *hydrogen bond acceptors*, *hydrogen bond donors*, dan lipofilisitas yang masih berada dalam kisaran yang direkomendasikan untuk transport pasif melalui membran biologis. Kondisi ini mengindikasikan bahwa proses difusi pasif kemungkinan menjadi mekanisme utama absorpsi kedua molekul di saluran gastrointestinal. Temuan tersebut juga konsisten dengan hasil prediksi GI absorption yang tinggi pada analisis SwissADME.

Selain memenuhi aturan Lipinski, kedua senyawa juga lolos Ghose Filter, yang mengevaluasi kesesuaian karakteristik fisikokimia berdasarkan berat molekul, molar refractivity, jumlah atom, dan koefisien partisi oktanol/air. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavon memiliki ukuran molekul dan distribusi elektron yang masih berada dalam rentang molekul obat yang telah berhasil dipasarkan. Dengan demikian, modifikasi struktur melalui penambahan gugus metoksi tidak menggeser karakteristik fisikokimia kedua senyawa keluar dari ruang kimia (*chemical space*) yang diinginkan untuk kandidat obat.

Keberhasilan memenuhi Veber Rule dan Egan Rule semakin memperkuat dugaan bahwa kedua senyawa memiliki bioavailabilitas oral yang baik. Kedua aturan tersebut lebih menitikberatkan pada hubungan antara polaritas molekul, jumlah ikatan rotasional, dan permeabilitas membran. Nilai TPSA yang berada di bawah $140 \text{ \AA}^2$ serta jumlah rotatable bonds yang tidak melebihi sepuluh menunjukkan bahwa fleksibilitas konformasi dan luas permukaan polar kedua senyawa masih mendukung proses difusi melalui epitel usus. Oleh karena itu, absorpsi oral diperkirakan tidak menjadi faktor pembatas utama dalam pengembangan kedua polimetoksiflavon.

Hasil yang sama juga diperoleh pada Muegge Rule, yang mengintegrasikan berbagai parameter fisikokimia untuk mengevaluasi karakteristik molekul yang menyerupai obat (*drug-like properties*). Keberhasilan kedua senyawa memenuhi seluruh kriteria tersebut menunjukkan bahwa penambahan satu gugus metoksi pada heptamethoxyflavone tidak mengurangi kesesuaian molekul terhadap berbagai model prediksi *drug-likeness*. Sebaliknya, kedua molekul tetap mempertahankan keseimbangan antara ukuran, polaritas, dan lipofilisitas yang dibutuhkan untuk kandidat obat oral.

Kedua senyawa juga memiliki Bioavailability Score sebesar 0,55, yang menunjukkan probabilitas sedang untuk mencapai bioavailabilitas oral yang memadai setelah pemberian secara oral. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa lebih dari separuh karakteristik struktural kedua molekul telah memenuhi persyaratan yang diperlukan untuk menghasilkan paparan sistemik yang memadai. Namun demikian, bioavailabilitas aktual tetap dipengaruhi oleh faktor lain, terutama kelarutan, stabilitas metabolik, dan formulasi sediaan.

Salah satu temuan penting dari penelitian ini adalah tidak ditemukannya PAINS Alerts pada kedua senyawa. Ketidadaan struktur PAINS menunjukkan bahwa kedua polimetoksisflavon tidak mengandung gugus kimia yang diketahui sering menyebabkan hasil positif palsu (*false positive*) pada berbagai uji biologis. Dengan demikian, aktivitas farmakologis yang akan diamati pada penelitian lanjutan diperkirakan lebih merefleksikan aktivitas biologis yang sebenarnya dibandingkan artefak pengujian.

Dari aspek pengembangan sintesis, kedua senyawa menunjukkan nilai Synthetic Accessibility sebesar 3,83 dan 4,05, yang masih berada pada kisaran sintesis relatif mudah hingga sedang. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kompleksitas struktur kedua molekul masih memungkinkan dilakukan sintesis maupun modifikasi kimia secara rasional apabila diperlukan optimasi struktur pada tahap *lead optimization*. Meskipun heptamethoxyflavone memiliki nilai yang sedikit lebih tinggi akibat adanya satu gugus metoksi tambahan, perbedaan tersebut relatif kecil dan diperkirakan tidak memberikan hambatan yang berarti terhadap proses sintesis.

Secara komparatif, kedua polimetoksisflavon menunjukkan profil *drug-likeness* yang hampir identik. Penambahan satu gugus metoksi pada heptamethoxyflavone tidak mengubah hasil evaluasi pada seluruh aturan *drug-likeness*, menunjukkan bahwa modifikasi struktur tersebut masih mempertahankan karakteristik molekul yang sesuai untuk kandidat obat oral. Dengan demikian, perbedaan utama antara kedua senyawa kemungkinan lebih berkaitan dengan aspek farmakokinetik, kelarutan, maupun interaksi biologis daripada kesesuaiannya terhadap kriteria *drug-likeness*.

Secara keseluruhan, hasil evaluasi menunjukkan bahwa 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone maupun 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone memiliki karakteristik molekul yang memenuhi seluruh aturan utama *drug-likeness*. Kombinasi antara kepatuhan terhadap berbagai *filter* prediksi, bioavailabilitas oral yang moderat, tidak adanya PAINS Alerts, serta kemudahan sintesis memberikan dasar yang kuat untuk mengembangkan kedua senyawa sebagai lead compounds dalam penelitian *drug discovery*. Namun demikian, keberhasilan pada tahap penyaringan komputasional ini masih memerlukan validasi melalui studi eksperimental yang meliputi evaluasi aktivitas biologis, stabilitas metabolik, farmakokinetik, serta keamanan secara *in vitro* dan *in vivo* [1] [7], [8], [9].

Kuantifikasi parameter ADME numerik dipaparkan secara mendalam pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Profil Kuantitatif Parameter ADME Berdasarkan pkCSM dan SwissADME

ADME Phase	Parameter	5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Interpretation
Absorption	Human Intestinal Absorption (%)	99.60	95.52	Excellent intestinal absorption
	Caco-2 Permeability (log Papp, cm/s)	1.20	0.77	High intestinal permeability
	Skin Permeability (log Kp, cm/s)	-2.74	-2.74	Low dermal penetration
	P-glycoprotein Substrate	No	No	Not susceptible to P-gp efflux
Distribution	VDss (log L/kg)	-0.36	-0.27	Moderate tissue distribution
	BBB Permeability (logBB)	-1.24	-1.47	Poor blood-brain barrier penetration
	CNS Permeability (logPS)	-3.44	-3.57	Limited CNS distribution
	Fraction Unbound	0.176	0.198	Moderate plasma protein binding
Metabolism	CYP1A2 Inhibitor	Yes	Yes	Potential CYP interaction
	CYP2C19 Inhibitor	Yes	Yes	Potential CYP interaction
	CYP2C9 Inhibitor	Yes	Yes	Potential CYP interaction
	CYP3A4 Inhibitor	Yes	Yes	Potential CYP interaction
	CYP2D6 Inhibitor	No	No	Low CYP2D6 interaction
	CYP2D6 Substrate	No	No	Not metabolized by CYP2D6
Excretion	Total Clearance (log	0.86	0.88	Moderate systemic clearance

mL/min/kg)			
Renal OCT2 Substrate	No	No	No active OCT2-mediated renal secretion

Profil farmakokinetik merupakan salah satu determinan utama dalam keberhasilan pengembangan kandidat obat karena menentukan jumlah senyawa yang mampu mencapai target biologis dalam konsentrasi terapeutik. Berdasarkan hasil prediksi pkCSM (Tabel 4), kedua polimetoksiflavon menunjukkan karakteristik ADME yang secara umum mendukung pengembangan sebagai kandidat obat oral.

Absorption

Tahap absorpsi menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan. Kedua senyawa diprediksi memiliki Human Intestinal Absorption (HIA) yang sangat tinggi, yaitu 99,60% pada 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 95,52% pada 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone. Nilai tersebut menunjukkan bahwa hampir seluruh molekul yang diberikan secara oral diperkirakan mampu melewati epitel usus dan memasuki sirkulasi sistemik. Tingginya absorpsi intestinal ini sejalan dengan hasil evaluasi SwissADME yang menunjukkan bahwa kedua senyawa memenuhi seluruh aturan *drug-likeness* serta memiliki prediksi gastrointestinal absorption yang tinggi.

Kemampuan absorpsi tersebut semakin diperkuat oleh nilai Caco-2 permeability yang melebihi 0,70 log Papp, menunjukkan bahwa kedua molekul memiliki permeabilitas tinggi terhadap membran epitel usus. Nilai permeabilitas yang sedikit lebih tinggi pada hexamethoxyflavone mengindikasikan bahwa senyawa tersebut kemungkinan memiliki laju difusi pasif yang lebih baik dibandingkan heptamethoxyflavone. Perbedaan tersebut kemungkinan berkaitan dengan ukuran molekul yang sedikit lebih kecil dan nilai TPSA yang lebih rendah sehingga hambatan sterik selama transport membran menjadi lebih kecil.

Selain itu, kedua senyawa diprediksi bukan merupakan substrat P-glycoprotein (P-gp). Temuan ini memiliki implikasi farmakokinetik yang penting karena P-gp merupakan transporter *efflux* yang dapat memompa obat kembali ke lumen usus sehingga menurunkan bioavailabilitas oral. Tidak adanya interaksi sebagai substrat P-gp menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavon memiliki kemungkinan lebih kecil mengalami *efflux*, sehingga konsentrasi obat yang berhasil diabsorpsi diperkirakan lebih tinggi.

Sebaliknya, nilai skin permeability ($\log K_p = -2,74$) menunjukkan bahwa kedua molekul memiliki kemampuan penetrasi transdermal yang relatif rendah. Oleh karena itu, kedua senyawa lebih sesuai dikembangkan sebagai sediaan oral dibandingkan formulasi topikal atau transdermal.

Distribution

Distribusi obat menentukan kemampuan molekul mencapai jaringan target setelah memasuki sirkulasi darah. Nilai Volume of Distribution (VD_{ss}) yang relatif rendah pada kedua senyawa menunjukkan bahwa distribusi jaringan diperkirakan terbatas dan sebagian besar molekul tetap berada dalam kompartemen plasma. Karakteristik tersebut dapat memberikan keuntungan apabila target terapi berada di jaringan perifer karena konsentrasi plasma yang tinggi berpotensi meningkatkan efektivitas farmakologis.

Prediksi Blood-Brain Barrier (BBB) permeability menghasilkan nilai logBB di bawah -1 pada kedua senyawa, sedangkan nilai logPS juga menunjukkan permeabilitas sistem saraf

pusat yang sangat rendah. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kedua polimetoksisflavon memiliki kemampuan yang terbatas untuk menembus sawar darah otak. Kondisi ini mengurangi kemungkinan terjadinya efek samping neurologis, namun sekaligus membatasi pemanfaatannya untuk terapi penyakit neurodegeneratif atau gangguan sistem saraf pusat.

Nilai fraction unbound masing-masing sebesar 0,176 dan 0,198 menunjukkan bahwa sebagian besar molekul diperkirakan berada dalam keadaan terikat protein plasma. Walaupun fraksi bebas relatif rendah, kondisi tersebut dapat memperpanjang waktu sirkulasi obat di dalam darah dan membantu mempertahankan konsentrasi terapeutik selama periode yang lebih lama.

Metabolism

Interaksi dengan enzim sitokrom P450 merupakan salah satu aspek penting dalam evaluasi keamanan farmakokinetik karena berhubungan dengan potensi interaksi obat (*drug-drug interaction*). Kedua senyawa diprediksi menghambat CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, dan CYP3A4, tetapi bukan inhibitor maupun substrat CYP2D6.

Temuan ini menunjukkan bahwa metabolisme kedua polimetoksisflavon kemungkinan melibatkan beberapa jalur enzimatis utama di hati, sehingga potensi interaksi dengan obat lain yang dimetabolisme oleh isoenzim tersebut perlu dipertimbangkan pada tahap pengembangan lebih lanjut. Sebaliknya, tidak adanya interaksi dengan CYP2D6 merupakan keuntungan karena enzim ini memiliki polimorfisme genetik yang tinggi dalam populasi manusia, sehingga variasi respons antarindividu diperkirakan lebih kecil.

Excretion

Parameter ekskresi menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki total clearance yang relatif serupa (0,86–0,88 log mL/min/kg), menunjukkan bahwa eliminasi sistemik berlangsung pada tingkat sedang. Nilai clearance yang tidak terlalu tinggi diperkirakan memungkinkan molekul bertahan lebih lama dalam sirkulasi sistemik sehingga dapat mempertahankan efek farmakologis tanpa memerlukan frekuensi pemberian yang terlalu sering.

Selain itu, kedua senyawa diprediksi bukan merupakan substrat transporter OCT2, menunjukkan bahwa eliminasi ginjal melalui mekanisme transport aktif diperkirakan tidak dominan. Dengan demikian, proses ekskresi kemungkinan lebih dipengaruhi oleh metabolisme hepatis dibandingkan ekskresi renal aktif.

Integrasi Profil ADME

Secara keseluruhan, kedua polimetoksisflavon menunjukkan profil farmakokinetik yang sangat menjanjikan sebagai kandidat obat oral. Kombinasi antara absorpsi intestinal yang sangat tinggi, permeabilitas membran yang baik, tidak menjadi substrat P-glycoprotein, serta eliminasi sistemik yang moderat menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki potensi menghasilkan paparan sistemik yang memadai setelah pemberian oral. Di sisi lain, keterbatasan penetrasi ke sistem saraf pusat menunjukkan bahwa aplikasi terapeutiknya kemungkinan lebih sesuai untuk penyakit perifer dibandingkan gangguan neurologis.

Bila dibandingkan secara langsung, 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone menunjukkan keunggulan pada aspek absorpsi intestinal dan permeabilitas Caco-2, sedangkan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone memiliki fraksi bebas plasma yang sedikit lebih tinggi. Meskipun demikian, perbedaan tersebut relatif kecil sehingga kedua molekul secara keseluruhan menunjukkan profil ADME yang sebanding dan layak dipertimbangkan sebagai lead compounds dalam pengembangan obat berbasis polimetoksisflavon.

3.5. Toksikologi Prediktif Komputasional (ProTox-II & pkCSM)

Keamanan praklinis disimulasikan secara mendalam guna mendeteksi *endpoint* toksisitas spesifik organ dan seluler molekuler, disajikan pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Pemodelan Endpoint Toksisitas dan Tingkat Keamanan Organ

Toxicological Parameter	5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Toxicological Interpretation
Acute Oral LD ₅₀ (mg/kg)	5000	5000	Very low acute toxicity
Acute Toxicity Class	Class 5	Class 5	Slightly hazardous; relatively safe after single oral exposure
Hepatotoxicity	Yes (0.69)	Yes (0.69)	Potential liver toxicity requiring further evaluation
Carcinogenicity	Yes (0.53)	Yes (0.53)	Low-confidence carcinogenicity signal
Immunotoxicity	Yes (0.91)	Yes (0.70)	Potential immune response modulation
Mutagenicity (AMES)	Yes (0.69)	Yes (0.69)	Requires experimental genotoxicity confirmation
Cytotoxicity	Yes (0.82)	Yes (0.82)	Potential cytotoxic activity toward mammalian cells
hERG II Inhibition	No	No	Low predicted cardiotoxicity risk

Evaluasi toksisitas merupakan tahapan yang sangat penting dalam proses penemuan obat karena bertujuan mengidentifikasi potensi efek samping sebelum suatu senyawa memasuki tahap pengujian praklinis maupun klinis. Pendekatan prediksi *in silico* memungkinkan identifikasi awal berbagai parameter toksikologi sehingga kandidat senyawa yang memiliki risiko tinggi dapat dieliminasi sejak tahap awal pengembangan.

Berdasarkan hasil prediksi menggunakan ProTox-II dan pkCSM (Tabel 5), kedua polimetoksiflavon menunjukkan profil toksisitas yang secara umum masih mendukung pengembangan sebagai kandidat obat oral, meskipun beberapa parameter tetap memerlukan validasi eksperimental.

Nilai LD₅₀ sebesar 5000 mg/kg pada kedua senyawa menunjukkan bahwa 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone maupun 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone memiliki toksisitas akut yang sangat rendah berdasarkan klasifikasi OECD. Kedua senyawa termasuk dalam Toxicity Class 5, yang mengindikasikan bahwa efek toksik akut baru diperkirakan muncul pada dosis yang relatif tinggi. Temuan ini menunjukkan adanya margin keamanan awal yang cukup baik untuk pemberian oral dan mengindikasikan bahwa risiko toksisitas akut kemungkinan bukan menjadi faktor pembatas utama dalam pengembangan kedua senyawa sebagai kandidat obat.

Meskipun demikian, hasil prediksi juga menunjukkan adanya potensi hepatotoksitas dengan probabilitas 0,69 pada kedua molekul. Mengingat hati merupakan organ utama dalam metabolisme xenobiotik, hasil ini menunjukkan bahwa metabolisme hepatik kemungkinan menjadi jalur eliminasi dominan bagi kedua polimetoksiflavon. Prediksi tersebut tidak dapat langsung diinterpretasikan sebagai bukti terjadinya kerusakan hati, tetapi lebih menunjukkan perlunya evaluasi lebih lanjut melalui pengukuran biomarker fungsi hati, seperti alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), serta pemeriksaan histopatologi hati pada studi praklinis.

Prediksi karsinogenisitas menghasilkan probabilitas 0,53, yang berada sedikit di atas ambang klasifikasi model prediksi. Nilai tersebut menunjukkan adanya sinyal prediktif dengan tingkat keyakinan rendah, sehingga belum dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa bersifat karsinogenik. Pada model berbasis *machine learning*, probabilitas yang mendekati nilai ambang sering kali hanya menunjukkan kemiripan struktur terhadap senyawa dalam basis data pelatihan, bukan bukti biologis langsung. Oleh karena itu, hasil tersebut perlu dikonfirmasi menggunakan uji genotoksitas dan studi karsinogenisitas jangka panjang sebelum diambil kesimpulan mengenai keamanan kronis kedua senyawa. Parameter imunotoksitas menunjukkan probabilitas yang relatif tinggi, terutama pada hexamethoxyflavone (0,91) dibandingkan heptamethoxyflavone (0,70). Hasil ini mengindikasikan bahwa kedua senyawa berpotensi memodulasi respons imun, baik melalui aktivasi maupun supresi jalur imunologis tertentu. Namun demikian, prediksi imunotoksitas tidak selalu berkorelasi dengan efek yang merugikan karena banyak senyawa bahan alam justru bekerja melalui mekanisme imunomodulator. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membedakan apakah prediksi tersebut mencerminkan aktivitas imunostimulasi yang bermanfaat atau justru potensi hipersensitivitas dan efek toksik terhadap sistem imun.

Prediksi mutagenisitas (AMES) juga memberikan hasil positif dengan probabilitas 0,69 pada kedua senyawa. Temuan ini menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan interaksi molekul dengan materi genetik, meskipun prediksi komputasional tidak dapat menggantikan pengujian genotoksitas secara eksperimental. Oleh karena itu, sebelum kedua molekul dipertimbangkan sebagai kandidat obat, diperlukan validasi menggunakan uji Ames, *micronucleus assay*, maupun *chromosomal aberration test* untuk memastikan tidak adanya efek mutagenik yang bermakna.

Selain itu, kedua polimetoksiflavon diprediksi memiliki aktivitas sitotoksik dengan probabilitas 0,82. Temuan ini perlu diinterpretasikan secara hati-hati karena sitotoksitas tidak selalu merupakan karakteristik yang merugikan. Pada konteks pengembangan obat antikanker, aktivitas sitotoksik justru dapat menjadi sifat yang diharapkan apabila selektif terhadap sel tumor. Sebaliknya, apabila sitotoksitas juga terjadi pada sel normal, maka kondisi tersebut dapat membatasi penggunaan terapeutik

kedua senyawa. Oleh karena itu, evaluasi *selective cytotoxicity* menggunakan berbagai lini sel normal dan kanker menjadi tahapan penting pada penelitian lanjutan.

Berbeda dengan beberapa parameter toksisitas lainnya, kedua senyawa diprediksi tidak menghambat kanal hERG II, yang menunjukkan risiko kardiotoxsisitas yang rendah. Kanal kalium hERG berperan penting dalam proses repolarisasi jantung, sehingga penghambatan kanal ini sering dikaitkan dengan pemanjangan interval QT dan aritmia ventrikel yang berpotensi fatal. Oleh karena itu, tidak ditemukannya prediksi inhibisi hERG merupakan salah satu indikator keamanan yang sangat penting dalam proses pengembangan obat, karena banyak kandidat obat gagal pada tahap praklinis maupun klinis akibat efek kardiotoxsik.

Secara komparatif, kedua polimetoksiflavon menunjukkan profil toksisitas yang hampir identik. Perbedaan utama hanya terlihat pada parameter imunotoksitas, di mana hexamethoxyflavone memiliki probabilitas prediksi yang sedikit lebih tinggi dibandingkan heptamethoxyflavone. Namun demikian, seluruh parameter toksisitas lainnya menunjukkan pola yang sangat serupa, mengindikasikan bahwa penambahan satu gugus metoksi tidak memberikan perubahan yang bermakna terhadap profil keamanan kedua senyawa.

Secara keseluruhan, hasil prediksi toksikologi menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavon memiliki profil keamanan awal yang cukup menjanjikan, ditandai dengan toksisitas akut yang rendah, tidak adanya risiko kardiotoxsisitas, serta margin keamanan oral yang relatif baik. Meskipun demikian, adanya prediksi hepatotoksitas, mutagenisitas, imunotoksitas, dan sitotoksitas menunjukkan bahwa kedua molekul masih memerlukan validasi melalui uji toksikologi in vitro dan in vivo sebelum dapat dipertimbangkan sebagai kandidat obat yang aman. Dengan demikian, hasil prediksi *in silico* pada penelitian ini sebaiknya dipandang sebagai alat penyaringan awal (*early toxicity screening*) yang memberikan arah bagi desain penelitian eksperimental berikutnya, bukan sebagai bukti definitif mengenai keamanan biologis kedua senyawa.

3.6. Penilaian Integratif Kelayakan Akhir Oral Drug Candidate

Sebagai sintesis akhir dari keseluruhan riset komputasional ini, evaluasi integratif disusun secara matriks pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Matriks Sintesis Akhir Kelayakan Kandidat Obat Oral

Evaluation Aspect	Key Finding	5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone	5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone (5'-Methoxynobiletin)	Implication for Drug Development
Physicochemical Properties	Drug-like physicochemical profile	Favorable	Favorable	Suitable for further computational studies
Oral Absorption	Human intestinal absorption	Excellent	Excellent	Candidate for oral administration

CNS Distribution	BBB permeability	Low	Low	More suitable for peripheral therapeutic targets
Systemic Exposure	Clearance and plasma retention	Moderate	Moderate	Pharmacokinetic optimization may be required
Drug-Drug Interaction	CYP inhibition profile	Potential interaction	Potential interaction	Experimental CYP validation is recommended
Safety Profile	Toxicological prediction	Moderate safety	Moderate safety with lower immunotoxicity prediction	Further <i>in vitro</i> toxicity assessment is required
Overall Assessment	Drug development potential	Promising oral lead compound	Highly promising oral lead compound	Recommended for molecular docking and biological validation

Integrasi hasil analisis fisikokimia, *drug-likeness*, farmakokinetik, dan toksisitas menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavon memiliki karakteristik yang mendukung untuk dikembangkan sebagai kandidat obat oral berbasis bahan alam. Seluruh parameter utama yang dianalisis melalui SwissADME, pkCSM, dan ProTox-II menunjukkan bahwa kedua molekul memenuhi sebagian besar kriteria yang umum digunakan dalam proses *early-stage drug discovery*. Dengan demikian, pendekatan komputasional yang digunakan pada penelitian ini memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk menentukan prioritas pengembangan kedua senyawa sebelum dilakukan validasi eksperimental.

Dari aspek fisikokimia, kedua senyawa memenuhi seluruh aturan utama *drug-likeness*, termasuk Lipinski Rule of Five, Ghose Filter, Veber Rule, Egan Rule, dan Muegge Rule, yang menunjukkan bahwa ukuran molekul, polaritas, fleksibilitas, dan lipofilisitas berada dalam kisaran yang sesuai untuk kandidat obat oral. Selain itu, nilai bioavailability score sebesar 0,55 menunjukkan bahwa kedua molekul memiliki probabilitas yang cukup baik untuk mencapai paparan sistemik setelah pemberian oral. Kombinasi karakteristik tersebut mengindikasikan bahwa kedua polimetoksiflavon telah memenuhi persyaratan awal sebagai *lead compounds* dalam pengembangan obat berbasis bahan alam.

Profil farmakokinetik juga menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan. Kedua senyawa diprediksi memiliki absorpsi intestinal yang sangat tinggi, permeabilitas Caco-2 yang baik, serta tidak merupakan substrat P-glycoprotein, sehingga peluang terjadinya *efflux* intestinal diperkirakan rendah. Karakteristik tersebut menunjukkan bahwa proses absorpsi oral kemungkinan berlangsung secara efisien melalui mekanisme difusi pasif. Sebaliknya, kemampuan penetrasi terhadap blood-brain barrier diprediksi sangat rendah, sehingga kedua senyawa lebih sesuai dikembangkan untuk terapi penyakit perifer dibandingkan gangguan sistem saraf pusat. Profil distribusi seperti ini berpotensi mengurangi risiko efek samping neurologis yang tidak diinginkan.

Meskipun demikian, evaluasi metabolisme menunjukkan bahwa kedua molekul diprediksi menghambat beberapa isoenzim utama sitokrom P450, terutama CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, dan CYP3A4. Temuan tersebut mengindikasikan adanya potensi interaksi obat (*drug-drug interaction*) apabila kedua senyawa diberikan bersamaan dengan obat lain yang dimetabolisme melalui jalur enzimatik yang sama. Oleh karena itu, penelitian lanjutan perlu difokuskan pada evaluasi metabolisme menggunakan sistem mikrosom hati maupun uji inhibisi CYP secara eksperimental untuk memastikan signifikansi biologis dari prediksi komputasional tersebut.

Dari aspek keamanan, kedua senyawa menunjukkan toksisitas akut yang rendah berdasarkan nilai LD₅₀ sebesar 5000 mg/kg dan klasifikasi Toxicity Class 5, yang menunjukkan margin keamanan awal yang cukup baik untuk pemberian oral. Selain itu, tidak ditemukannya prediksi inhibisi kanal hERG menunjukkan bahwa risiko kardiotoksitas diperkirakan rendah. Namun demikian, hasil prediksi juga mengidentifikasi potensi hepatotoksitas, mutagenisitas, dan imunotoksitas yang memerlukan konfirmasi lebih lanjut melalui pengujian *in vitro* maupun *in vivo*. Oleh karena itu, hasil prediksi toksikologi pada penelitian ini harus dipandang sebagai proses penyaringan awal, bukan sebagai bukti definitif mengenai keamanan biologis kedua senyawa.

Perbandingan langsung antara kedua polimetoksiflavin menunjukkan bahwa 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone memiliki profil yang sedikit lebih baik pada aspek keamanan imunologis, sedangkan 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone menunjukkan absorpsi intestinal dan permeabilitas Caco-2 yang sedikit lebih tinggi. Perbedaan tersebut relatif kecil dan tidak mengubah kesimpulan bahwa kedua senyawa sama-sama memenuhi karakteristik dasar kandidat obat oral. Namun, apabila seluruh parameter dipertimbangkan secara bersamaan, heptamethoxyflavone menunjukkan keseimbangan yang sedikit lebih baik antara sifat fisikokimia, farmakokinetik, dan profil toksisitas sehingga dapat diprioritaskan sebagai molekul utama untuk tahap pengembangan berikutnya.

Berdasarkan integrasi seluruh hasil prediksi, penelitian ini menunjukkan bahwa kedua polimetoksiflavin memiliki potensi yang kuat untuk dikembangkan sebagai lead compounds dalam proses penemuan obat berbasis bahan alam. Tahapan penelitian berikutnya sebaiknya difokuskan pada molecular docking terhadap target protein yang relevan, dilanjutkan dengan molecular dynamics simulation, pengujian aktivitas biologis *in vitro*, evaluasi farmakokinetik *in vivo*, serta optimasi formulasi untuk mengatasi keterbatasan kelarutan yang masih menjadi salah satu hambatan utama terhadap peningkatan bioavailabilitas oral. Pendekatan bertahap tersebut akan memberikan bukti yang lebih komprehensif mengenai potensi terapeutik kedua senyawa sebelum memasuki tahap pengembangan praklinis.

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone dan 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone memiliki karakteristik fisikokimia, drug-likeness, dan profil ADMET yang mendukung pengembangannya sebagai kandidat obat oral berbasis bahan alam. Kedua senyawa memenuhi seluruh aturan utama drug-likeness, memiliki absorpsi usus yang sangat tinggi, permeabilitas membran yang baik, serta toksisitas akut yang rendah. Meskipun demikian, potensi interaksi terhadap beberapa enzim CYP450 serta prediksi hepatotoksitas, mutagenisitas, dan imunotoksitas memerlukan validasi melalui pengujian eksperimental. Secara komparatif, 5,6,7,8,3',4',5'-Heptamethoxyflavone menunjukkan keseimbangan profil farmakokinetik dan keamanan yang sedikit lebih baik dibandingkan 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone, sehingga lebih layak diprioritaskan sebagai *lead compound* untuk

penelitian lanjutan, termasuk molecular docking, molecular dynamics simulation, serta studi *in vitro* dan *in vivo*.

Daftar Pustaka

- [1] D. Sun, W. Gao, H. Hu, and S. Zhou, "Why 90 % of clinical drug development fails and how to improve it?," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 12, no. 7, pp. 3049–3062, 2022, doi: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
- [2] F. Wu *et al.*, "Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development," *Front. Chem.*, vol. 8, no. September, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00726.
- [3] D. E. V. Pires, T. L. Blundell, and D. B. Ascher, "pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 9, pp. 4066–4072, 2015, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- [4] Z. Mushtaq *et al.*, "Polymethoxyflavones: an updated review on pharmacological properties and underlying molecular mechanisms," *Int. J. Food Prop.*, vol. 26, no. 1, pp. 866–893, 2023, doi: 10.1080/10942912.2023.2189568.
- [5] C. A. S. Bergström, W. N. Charman, and C. J. H. Porter, "Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 101, pp. 6–21, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.02.005.
- [6] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019," *J. Nat. Prod.*, vol. 83, no. 3, pp. 770–803, 2020, doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- [7] T. Moses, K. K. Papadopoulou, and A. Osbourn, "Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 49, no. 6, pp. 439–462, 2014, doi: 10.3109/10409238.2014.953628.
- [8] F. Makkiyah, E. P. Rahmi, R. Revina, T. Susantiningih, and Y. Setyaningsih, "Graptophyllum pictum (L.) griff. (syn: Justicia picta linn.) and its effectiveness: A well-known indonesian plant," *Pharmacogn. J.*, vol. 13, no. 3, pp. 835–838, 2021, doi: 10.5530/pj.2021.13.106.
- [9] I. Muegge, S. L. Heald, and D. Brittelli, "Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter," vol. 44, no. 12, 2001.