

## Uji Aktivitas *In Silico* Senyawa Turunan Flavonoid sebagai Antiviral (HIV)

Arini Nabila Putri\*, apt. Taufik M Fakhri, M.S.Farm., Dr. Dina Mulyanti, M.Si

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

\* arinnabil3007@gmail.com,taufikmuhammadf@gmail.com, dina.sukma83@gmail.com

**Abstract.** Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 is an HIV virus that most often attacks the human body's immunity and is easy to mutate. A total of 37.9 million people according to the World Health Organization (WHO) were infected in 2018 with high levels of mortality and morbidity. Drug search research continues to be carried out, one of which is research on HIV protease which is an enzyme that has a role in the process of cutting polyprotein chains on the gag and gag-pol sides as the formation of new viroin. Myricetin is a flavonoid compound from the chives plant (*Allium tuberosum*). Compound design research has been carried out, molecular tethering using Autodock software obtained the best bond-free energy value in myricetin compounds of -8.10 kcal / mol compared to curcumin compounds of -9.60 kcal / mol, previously validated to calibrate the docking method, rmsd value obtained was 1.14Å, analysis of docking results using Biovia Discovery Studio Visualizer 2021, toxicity test using the preADME website in silico against Flavonoid derivative compounds, based on toxicity tests obtained the results of myricetin with mutagenicity against ames test, are negative against the carcinogenicity of mice or rats and are toxic to algae plants.

**Keywords:** Anti HIV-1 *Reverse Transcriptase*, *in silico*, Myricetin

**Abstrak.** *Human Immunodefisiensi Virus* (HIV) tipe 1 adalah virus HIV yang paling sering menyerang kekebalan tubuh manusia dan mudah untuk bermutasi. Sebanyak 37,9 juta orang menurut *World Health Organization* (WHO) terinfeksi pada tahun 2018 dengan tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi. Penelitian pencarian obat terus dilakukan salah satunya penelitian terhadap protease HIV yang merupakan enzim yang memiliki peran pada proses pemotongan rantai poliprotein pada sisi *gag* dan *gag-pol* sebagai pembentukan viroin yang baru. *Myricetin* merupakan senyawa flavonoid dari tumbuhan kucai (*Allium tuberosum*). Telah dilakukan penelitian desain senyawa, penambatan molekular menggunakan *software Autodock* diperoleh nilai energi bebas ikatan terbaik pada senyawa myricetin sebesar -8,10 kcal/mol dibandingkan dengan senyawa kurkumin sebesar -9,60 kcal/mol, sebelumnya dilakukan validasi untuk mengkalibrasi metode docking, nilai RMSD yang diperoleh sebesar 1,14Å, analisis hasil docking menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021*, uji toksisitas menggunakan website preADME secara *in silico* terhadap senyawa turunan flavonoid, berdasarkan uji toksisitas diperoleh hasil *myricetin* bersifat mutagen terhadap ames test, bersifat negatif terhadap karsinogenitas mencit atau tikus dan bersifat toksik terhadap tumbuhan algae.

**Kata Kunci:** Anti HIV-1 *Reverse Transcriptase*, *in silico*, Myricetin.

## A. Pendahuluan

*Human Immunodefisiensi Virus* (HIV) merupakan virus yang termasuk kedalam genus *Lentivirus* dari *family Retroviridae* yang menyerang sistem kekebalan tubuh. Berdasarkan karakteristik genetik dan perbedaan antigen virus, HIV diklasifikasikan menjadi HIV tipe 1 dan HIV tipe 2 (Blood, 2016). HIV tipe 1 adalah jenis virus yang paling umum menyerang manusia, setiap virus HIV yang bereplikasi membuat kesalahan, hal ini menunjukkan bahwa virus HIV merupakan target yang terus bergerak. Akibatnya berbagai penelitian mengenai pengobatan HIV terutama inhibitor HIV-1 terus dilakukan untuk perkembangan pengobatannya (Gu et al., 2015)

Pada tahun 2018 sekitar 39,7 juta orang diseluruh dunia mengidap HIV, dan 23,3 juta orang telah mendapatkan pengobatan antiretroviral, 1,7 juta orang tertular HIV dan 0,8 juta orang meninggal dunia (WHO, 2018). Di Indonesia kasus HIV terus meningkat setiap tahunnya, pada tahun 2015 tercatat 30.935 kasus, tahun 2016 sebanyak 21.250 kasus dan pada tahun 2017 jumlahnya terus meningkat menjadi 48.300 kasus (Kesehatan, 2018). Berdasarkan prevalensi tersebut maka virus HIV termasuk kedalam kategori virus yang memiliki tingkat morbiditas yang sangat tinggi.

Terapi antiretrovirus yang tidak efektif dapat menyebabkan munculnya resistensi terhadap virus. *Reverse Transcriptase* HIV yang secara alami akan mendorong terjadinya evolusi keragaman genetik yang cepat serta kecenderungan berkembangnya resistensi terhadap obat antiretrovirus (Stephen dan Ghilman, 2012). Berdasarkan hal tersebut, penemuan dan pengembangan senyawa baru anti HIV dengan modifikasi molekul sudah banyak dilakukan hingga saat ini dengan target berbagai enzim virus HIV terutama enzim vital untuk proses reproduksi virus seperti *Reverse Transcriptase*, integrase dan protease (Callies et al., 2015; Feng et al., 2009; Gu et al., 2015).

Langkah awal dalam upaya merancang dan mengembangkan obat baru sebagai anti-HIV yaitu dengan mengembangkan kandidat obat yang sudah ada dan telah diketahui aktivitas biologisnya sebagai penuntun (Firdayani, 2012). Salah satunya yaitu pendekatan secara *in silico* seperti *molecular docking* (Ruswanto, 2015). Pendekatan ini dipilih karena memiliki kelebihan tersendiri dibandingkan dengan pendekatan secara *in silico* maupun *in vitro*, diantaranya waktu yang digunakan lebih cepat dan biaya yang digunakan lebih sedikit (Ekins et al., 2002).

Studi *in silico* pada penelitian ini menggunakan struktur tiga dimensi protein target (*Reverse Transcriptase* HIV) yang diunduh dari protein data bank, kemudian divalidasi dan dilakukan penambatan molekular dengan ligan senyawa turunan flavonoid pada reseptor spesifik menggunakan perangkat lunak *autodock* untuk mengetahui afinitas energi ikatannya sehingga dapat digunakan sebagai dasar penemuan dan pengembangan obat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui afinitas energi ikatan senyawa turunan flavonoid sebagai ligan terhadap reseptor *Reverse Transcriptase* HIV-1 melalui *molecular docking*. Hipotesis dari penelitian ini yaitu bahwa senyawa turunan flavonoid berpotensi sebagai inhibitor enzim *Reverse Transcriptase* HIV-1. Selain itu, penelitian ini menerapkan *Lipinski's Rule of Five* yaitu untuk membedakan antara molekul *drug-like* dan *non drug-like* dengan memperhatikan tingkat absorpsi terhadap lipid bilayer yang terdapat pada tubuh manusia dan uji toksisitas secara *in silico* sehingga salah satu pengembangan perancangan obat dapat ditemukan senyawa baru yang diharapkan memiliki aktivitas anti-HIV lebih baik dibandingkan senyawa pada penelitian-penelitian sebelumnya dan diketahui tentang toksisitasnya.

## B. Metodologi Penelitian

### Penentuan Aktivitas Biologi

penentuan aktivitas biologi dilakukan dari website <http://way2drug.com/passonline/> terhadap senyawa uji yaitu Myricetin dan Kurkumin dengan tujuan untuk mendapatkan data aktivitas biologi pada setiap senyawa yang diuji

### Pengunduhan Struktur Makromolekul

Dilakukan pengunduhan makromolekul reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase* dari

data base situs resmi yaitu [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (*Protein Data Bank*) dengan kode PDB 1REV yang akan digunakan untuk tahap selanjutnya yaitu pada proses validasi metode docking. Alasan digunakannya reseptor reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase* karena reseptor reseptor *HIV-1 Reverse Transcriptase* ini merupakan reseptor spesifik untuk penyakit HIV, sehingga diharapkan senyawa yang nantinya diuji dapat berikatan dengan reseptor untuk mengobati penyakit HIV itu sendiri.

Setelah dilakukan pengunduhan reseptor tersebut, makromolekul tersebut dibuka dengan menggunakan *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019*. Tetapi pada saat diunduh dari data base situs resmi [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (*Protein Data Bank*), makromolekul tersebut banyak mengandung molekul air sehingga perlu dilakukan penghapusan molekul air agar tidak mengganggu proses docking. Kemudian dilakukan preparasi menggunakan *software Autodock Tools* versi 4.2 meliputi penambahan atom hidrogen, dimana penambahan atom hidrogen hidrogen itu sendiri bertujuan untuk melengkapi hidrogen pada strukturnya karena pada saat makromolekul tersebut di download atom hidrogennya belum lengkap. Selanjutnya ditambahkan muatan parsial yang bertujuan untuk menetralkan muatan yang terkandung pada reseptor tersebut.

### Validasi Metode Docking

Validasi dilakukan dengan tujuan untuk mengkalibrasi metode docking. Proses validasi dilakukan pada kondisi tanpa air untuk meminimalisir pengaruh keberadaan air terhadap proses docking. Keberadaan air sangat mencerminkan kondisi fisiologis tubuh. Secara teoritis, air akan menghalangi ikatan ligand dengan reseptornya karena air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan reseptor. Proses validasi dilakukan untuk mendapatkan aplikasi penambatan yang sesuai dengan cara melakukan pengamatan hasil nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) antara ligan dengan protein target. Nilai RMSD merupakan jarak yang ditimbulkan akibat interaksi antar ligan internal dengan protein target mulai dari nilai paling rendah sampai paling tinggi. Semakin kecil nilai RMSD maka semakin baik dengan ketentuan spesifik nilai  $RMSD \leq 2\text{\AA}$ . Nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) sangat dipengaruhi juga oleh resolusi protein reseptor dan metode pemodelan reseptor yang digunakan. Proses validasi dilakukan pada binding site pocket ligand dengan 100 kali replikasi. Semakin banyak replikasi yang dilakukan maka semakin baik aplikasi tersebut digunakan untuk penambatan (Muchtaridi *et al.*, 2018).

Reseptor yang digunakan yaitu reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase* yang telah diunduh pada situs resmi [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (*Protein Data Bank*). Ukuran grid box yang digunakan pada proses validasi metode *docking* ini dengan ukuran grid box, ukuran grid center dan spasing (angstrom) sesuai tabel dibawah ini yaitu :

**Tabel III.1** Nilai Ukuran Grid Box, Grid Center dan Spasing Validasi

Ukuran Grid Box			Ukuran Grid Center			Spasing (angstrom)
X	Y	Z	X	Y	Z	
40	40	40	1,017	-37,415	22,001	0,375

### Simulasi Penambatan Molekuler

Simulasi *docking* merupakan interaksi penambatan antara ligan dan protein yang digunakan untuk prediksi posisi dan orientasi ligan ketika terikat pada reseptor protein (Girija *et al.*, 2010). Dari hasil proses docking akan diperoleh energi ikatan ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) yang merupakan parameter kestabilan konformasi antara ligan dengan reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase*. Ligan dan reseptor yang saling berinteraksi akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah, kondisi ini menyebabkan molekul akan berada pada keadaan yang stabil sehingga semakin kecil harga  $\Delta G$  interaksi ligan dengan reseptor maka akan semakin stabil.

### Analisis Hasil Docking

Hasil dari simulasi *docking* dianalisis dengan menggunakan *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019*. Analisis data dari hasil *docking* ini untuk mengamati interaksi residu asam amino pada senyawa Xanthohumol, Epicatechin, Epigallocatechin, Curcumin, dan Myricetin dengan cara menampilkan visualisasi dari kelima senyawa tersebut yang berikatan dengan reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase*.

### Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas merupakan proses yang dilakukan dengan tujuan untuk memprediksi sifat toksik dari suatu senyawa yang nantinya akan digunakan sebagai kandidat obat. Prediksi toksisitas ini dilakukan menggunakan website preADME terhadap kelima senyawa uji.

### C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pa	Pi	Activity
0,984	0,001	Chlordecone reductase inhibitor
0,969	0,002	HIF1A expression inhibitor
0,967	0,001	2-Dehydropantoate 2-reductase inhibitor
0,968	0,002	Membrane integrity agonist
0,966	0,001	Peroxidase inhibitor
0,964	0,002	HMOX1 expression enhancer
0,963	0,001	Antimutagenic
0,961	0,001	Aryl-alcohol dehydrogenase (NADP+) inhibitor
0,959	0,002	Membrane permeability inhibitor
0,958	0,001	Kinase inhibitor

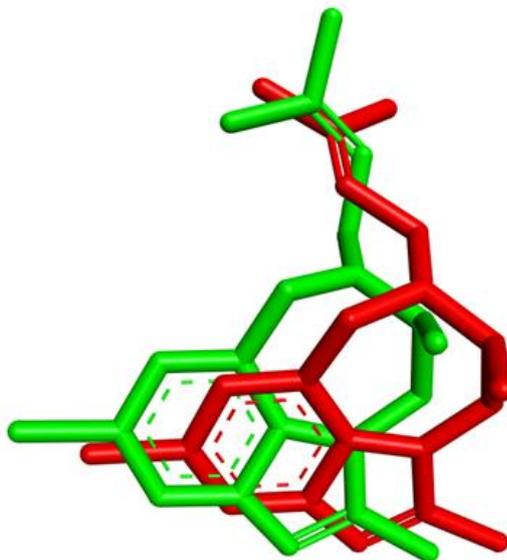
Hasil penentuan aktivitas biologi senyawa Myricetin dapat disimpulkan bahwa Myricetin memiliki aktivitas terhadap Chlordecone reductase inhibitor, HIF 1A expression inhibitor, 2-Dehydropantoate 2-reductase inhibitor, Membrane integrity agonist, Peroxidase inhibitor dan berperan sebagai HIV-1 integrase (3'-Processing) inhibitor. Akan tetapi Myricetin memiliki aktivitas biologi utama terhadap Chlordecone reductase inhibitor hal ini ditandai dengan nilai Pa nya yang paling besar dan mendekati 1 yaitu sebesar 0,984.

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	5	-10,03	0,00	1,14	RANKING
1	2	71	-9,99	1,03	0,57	RANKING
1	3	72	-9,98	1,03	0,58	RANKING
1	4	6	-9,97	1,02	0,61	RANKING
1	5	7	-9,91	1,00	0,67	RANKING
1	6	15	-9,91	1,02	0,66	RANKING
1	7	54	-9,91	1,02	0,68	RANKING
1	8	77	-9,91	1,02	0,68	RANKING
1	9	14	-9,91	1,03	0,68	RANKING
1	10	49	-9,90	1,02	0,66	RANKING

**Gambar 1** Tabel hasil validasi metode docking

Berdasarkan tabel diatas, nilai RMSD yang didapat pada proses validasi penelitian ini adalah 1,14 Å dimana, nilai RMSD yang dihasilkan dibawah nilai ketentuan dari nilai RMSD yaitu  $\leq 2$  angstrom. Berdasarkan hasil yang didapat dari hasil validasi ini yaitu dapat dipastikan bahwa metode yang digunakan bersifat valid atau memenuhi syarat seharusnya, nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal. Dan juga diperoleh nilai *binding energy* sebesar -10,03 dimana

nilai *binding energy* yang diperoleh kecil, sehingga ikatan antara ligan dan reseptornya semakin baik dan semakin stabil.



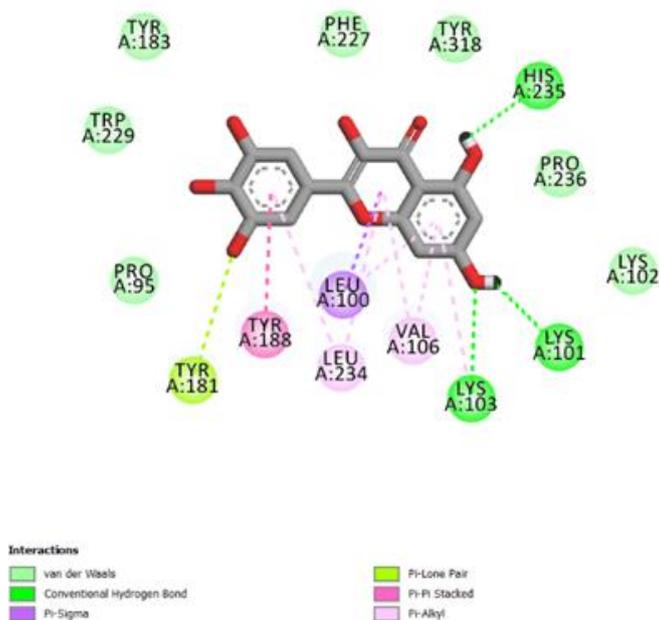
**Gambar 2** Visualisasi ligan sebelum dan sesudah dilakukan validasi

Berdasarkan gambar hasil visualisasi validasi metode *docking* ini dapat dinyatakan bahwa validasi yang dilakukan mendapat hasil yang baik dan metode yang digunakan sudah valid. Dapat dilihat pada gambar visualisasi validasi bahwa jarak antara ligan alami dan ligan hasil docking yaitu 1,14 Å, dan tidak lebih dari 2 angstrom.

Nama Senyawa	Nilai Binding Energi	Nilai Konstanta Inhibisi
Myricetine	-8,10 kcal/mol	91,48 nm
Kurkumin	-9,60 kcal/mol	1,16 μm

**Gambar 3** Tabel Hasil penambatan molekular senyawa uji

Berdasarkan tabel data hasil *docking* senyawa uji diatas, menunjukkan bahwa nilai energi ikatan yang paling baik diantara senyawa diatas adalah senyawa Myricetin karena senyawa Myricetin memiliki nilai energi ikatan yang paling kecil dengan nilai energi ikatan sebesar -8,10 kcal/mol, yang artinya bahwa ikatan senyawa Myricetin dengan reseptor HIV-1 *Reverse Transcriptase* ini memiliki ikatan yang semakin stabil dibandingkan dengan senyawa lainnya.



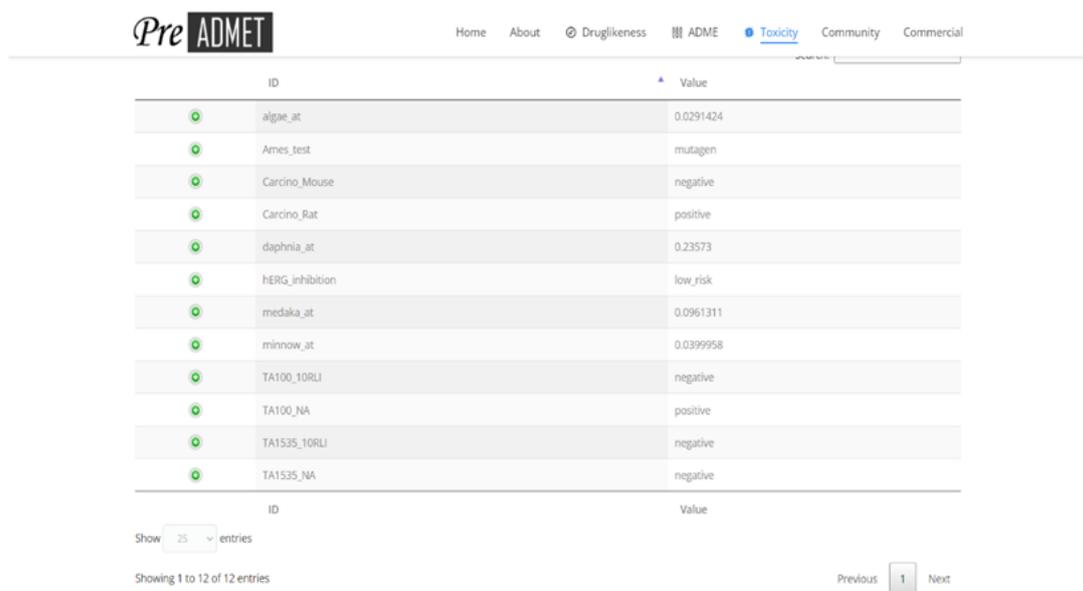
**Gambar 4** Ikatan Residu Asam Amino Senyawa Myricetin dengan Reseptor

Berdasarkan hasil visualisasi antara senyawa Myricetin dengan reseptor HIV-1 Reverse Transcriptase diatas, menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan dengan beberapa asam amino seperti berikut ini,

Nama Residu	Jarak	Interaksi
LYS103	3,06572	Hidrogen
HIS235	2,2208	Hidrogen
LYS101	2,02157	Hidrogen
LEU 100	3,54442	Hidrofobik
TYR188	4,27762	Hidrofobik
VAL106	4,72256	Hidrofobik
LEU234	4,9007	Hidrofobik

**Gambar 5** Residu Asam Amino Senyawa Myricetin

Pada tabel diatas menunjukkan bahwa senyawa Myricetin ini berikatan dengan beberapa asam amino yaitu Lysin, Histidin, Leusin, Tyrosine, dan Valin. Asam amino yang berikatan dengan senyawa Myricetin ini memiliki berbagai macam interaksi yang menghasilkan ikatan hidrogen dan hidrofobik.



ID	Value
algae_at	0.0291424
Ames_test	mutagen
Carcino_Mouse	negative
Carcino_Rat	positive
daphnia_at	0.23573
HERG_inhibition	low_risk
medaka_at	0.0961311
minnow_at	0.0399958
TA100_10RLI	negative
TA100_NA	positive
TA1535_10RLI	negative
TA1535_NA	negative

**Gambar 6** Tabel hasil pengujian toksisitas senyawa myricetine

Dari data hasil preADME senyawa Myricetin diatas, dapat disimpulkan bahwa Myricetin bersifat mutagen terhadap ames test (mutagen terhadap bacterium salmonella), bersifat negatif terhadap karsinogenitas terhadap mencit atau tikus, dan bersifat toksik akut terhadap tumbuhan algae.

#### D. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan yang telah diuraikan diatas, peneliti menyimpulkan hasil penelitian yang meliputi :

1. Senyawa Myricetine merupakan senyawa yang memiliki afinitas paling baik dibandingkan senyawa kurkumin berdasarkan nilai energi bebas ikatan sebesar -8,10 kcal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 1,16  $\mu$ M.
2. Interaksi yang terbentuk antara ligan terhadap reseptor *Reverse Transcriptase* HIV yaitu ikatan hidrogen (Lys103, His235, dan Lys101), dan Interaksi Hidrofobik (Leu100, Tyr188, Val106, dan Leu234)

#### Acknowledge

Saya mengucapkan terimakasih banyak kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan penelitian ini baik sebelum, selama penelitian dan setelah penelitian ini berlangsung.

#### Daftar Pustaka

- [1] Barret, R. (2018). Lipinski's Rule of Five. In Therapeutical Chemistry.
- [2] Callies O, Bedoya LM, Beltrán M, Muñoz A, Calderón PO, Osorio AA, Jimenez IA, Alcami J, Bazzocchi IL. (2015). Isolation, structural modification, and HIV inhibition of pentacyclic lupane-type triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Maytenus cuzcoina*. *Journal of Natural Products*. 78(5): 1045– 1055.
- [3] Ekins S, Mestres J, Testa B. 2002. In silico pharmacology for drug discovery: application to targets and beyond. *British Journal of Pharmacology Review*. 152: 21-37.
- [4] Feng XQ, Liang YH, Zeng Z, Sen, Chen FE, Balzarini J, Pannecouque C, De Clercq E. 2009. Structural modifications of DAPY analogues with potent anti-HIV-1 activity.

- ChemMedChem. 4(2): 219–224.
- [5] Firdayani. 2012. Pengembangan Kandidat Senyawa Obat Turunan Naftokuinon Sebagai Inhibitor Virus Hepatitis B. Prosiding InSINas : 35-39.
- [6] Gu SX, Zhu YY, Chen FE, De Clercq E, Balzarini J, Pannecouque C. 2015. Structural modification of diarylpyrimidine derivatives as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Medicinal Chemistry Research. 24(1).
- [7] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 23, 3-25.
- [8] Stephen, Gilman AG. 2012. Dasar Farmakologi Terapi, edisi 10 volume 3. Jakarta (ID): :EGC