



Antiviral Activity and Toxicity Prediction of Compounds Contained in Figs (*Ficus carica* L.) by *In Silico* Method

Sophi Damayanti^{1,2*}, Khonsa Khonsa¹, Tasia Amelia¹

¹Department of Pharmacochemistry, School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia

²University Center of Excellence on Artificial Intelligence for Vision, Natural Language Processing & Big Data Analytics (U-CoE AI-VLB)-ITB

Submitted 4 August 2020; Revised 6 September 2020; Accepted 20 October 2020; Published 5 February 2021

*Corresponding author: sophi.damayanti@fa.itb.ac.id

Abstract

Viral infection is a global health problem that can cause endemic to a pandemic. Compounds delivered from plants has been developed as an alternative antiviral agent. One of the plants that can be used as antiviral therapy is *Ficus carica* L. (figs). This research aims to predict the inhibitory activity and toxicity of compounds in figs as an antiviral for HIV-1 using the *in silico* method. Compounds were docked to the HIV-1 Reverse Transcriptase protein (PDB ID: 3LAL). Three-dimensional structures were modelled using GaussView and optimized using Gaussian 09W. Optimized compounds were docked to the target protein using AutoDock Tools and the interaction to protein binding side was analyzed compared to the standard compounds, namely nevirapine, efavirenz, and doravirine. The compound toxicity was analyzed using ECOSAR and Toxtree. Based on the results, the compounds that have similar interaction to the standard compounds were campesterol which has four similar hydrophobic interactions. Based on the classification of Cramer Rules for toxicity test, campesterol is classified in Class 3 (high toxicity), and according to the Benigni/Bossa Rulebase classification, campesterol is negative for genotoxic and nongenotoxic carcinogenicity.

Keywords: Antivirus, HIV, figs, molecular docking, toxicity.

Prediksi Aktivitas Inhibisi dan Toksisitas Beberapa Senyawa dalam Buah Tin (*Ficus carica* L.) Sebagai Antivirus secara *In Silico*

Abstrak

Infeksi virus merupakan masalah kesehatan global yang dapat menyebabkan endemi hingga pandemi. Senyawa-senyawa yang berasal dari tumbuhan telah dikembangkan sebagai alternatif terapi antivirus. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai antivirus adalah *Ficus carica* L. (Buah Tin). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memprediksi aktivitas inhibisi dan toksisitas beberapa senyawa yang terkandung dalam buah tin (*Ficus carica* L.) sebagai antivirus untuk HIV-1 menggunakan metode *in silico*. Senyawa uji dan pembanding ditambahkan ke protein HIV-1 *reverse transcriptase* (PDB ID: 3LAL). Struktur tiga dimensi senyawa uji dan pembanding dimodelkan menggunakan GaussView dan dioptimasi menggunakan Gaussian 09W. Senyawa-senyawa yang telah dioptimasi ditambahkan ke protein target menggunakan Autodock Tools dan dianalisis interaksinya pada situs pengikatan protein dengan membandingkan terhadap senyawa pembanding, yaitu nevirapin, efavirenz, dan doravirin. Toksisitas senyawa dianalisis menggunakan ECOSAR dan Toxtree. Berdasarkan hasil analisis, senyawa yang memiliki interaksi paling mirip dengan senyawa pembanding adalah kampesterol dengan 4 interaksi hidrofobik yang sama. Berdasarkan klasifikasi *Cramer Rules* untuk uji toksisitas, senyawa kampesterol diklasifikasikan dalam kelas 3 (toksisitas tinggi) dan berdasarkan klasifikasi *Benigni/Bossa Rulebase*, senyawa kampesterol tidak bersifat karsinogen genotoksik dan nongenotoksik.

Kata Kunci: Antivirus, buah tin, penambahan molekul, toksisitas.

1. Pendahuluan

Infeksi virus merupakan masalah kesehatan global yang dapat menyebabkan endemi hingga pandemi. Beberapa virus masih belum memiliki pengobatan yang efektif. Pengembangan beberapa obat konvensional mengalami kegagalan dalam melawan infeksi virus dan dapat menimbulkan resistensi virus. Oleh karena itu, salah satu alternatif terapi antivirus yang banyak dikembangkan adalah menggunakan senyawa yang berasal dari tumbuhan.¹

Ficus carica L. (buah tin) merupakan salah satu buah yang banyak dikonsumsi baik dalam bentuk kering maupun segar. Secara *in vitro*, buah tin memiliki aktivitas antivirus terhadap virus herpes simplex, echovirus, dan adenovirus.² Namun penelitian aktivitas antivirus buah tin tersebut belum dikembangkan lebih lanjut dan belum banyak penelitian aktivitas antivirus buah tin terhadap jenis virus lainnya. Berdasarkan penelitian fitokimia yang telah dilakukan, buah tin mengandung senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, fitosterol, asam organik, antosianin, triterpenoid, kumarin, dan senyawa volatil seperti hidrokarbon, alkohol alifatik, serta beberapa golongan metabolit sekunder lainnya.³ Beberapa metabolit sekunder yang terkandung dalam buah tin adalah psoralen, angelisin, bergapten, rutaretin, pimpinellin, seselin, β -sitosterol, kampesterol, β -amirin, sianidin-3-O-glikosida, aristolon, dll.^{4,5}

Di antara antivirus yang berpeluang besar untuk dikembangkan adalah antivirus untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). HIV merupakan spesies lentivirus yang menyerang sel-sel CD4 di dalam sistem kekebalan tubuh.⁶ HIV tipe 1 adalah virus HIV yang dominan menginfeksi manusia dan menyebabkan epidemi.⁷ Berdasarkan data WHO tahun 2018, terdapat 37,9 juta orang di dunia dan 327.000 orang di Indonesia yang hidup menderita HIV. Obat yang digunakan untuk terapi HIV diantaranya adalah anti-retroviral dengan mekanisme inhibisi protein *nucleoside analogue reverse transcriptase* (NRTI), *non-nucleoside reverse transcriptase* (NNRTI), dan protease (PI).

Tahap awal dalam penemuan obat

baru yang saat ini banyak dikaji adalah studi interaksi secara *in silico* yang diawali dengan penambatan molekul, yaitu prediksi konformasi dan orientasi ligan di dalam situs pengikatan pada protein target menggunakan suatu perangkat lunak untuk memprediksi aktivitasnya.⁸ Keuntungan dari metode *in silico* adalah lebih ekonomis, efisiensi waktu, dan pengerjaannya lebih mudah. Hasil dari studi *in silico* diuji lebih lanjut secara *in vitro* dan *in vivo*.

Studi *in silico* aktivitas senyawa yang terkandung dalam buah tin belum banyak dilaporkan sehingga dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk memprediksi aktivitas inhibisi dan toksisitas senyawa yang terkandung dalam buah tin (*Ficus carica* L.) sebagai antivirus HIV secara *in silico*.

2. Metode

2.1. Alat

Laptop Acer Z476 31TB Intel(R) Core(TM) i3-6006U CPU @2,20 GHz RAM 4GB, Program AutoDock 4.2.6, AutoDockTools v.1.5.6 (The Scripps Research Institute, US), Discovery Studio v.4.0 (BIOVIA, US), Gaussian 09W (Gaussian, Inc., US), GaussView 5.0, ECOSAR v2.0 (EPA, US), dan Toxtree v3.1.0 (IDEAconsult Ltd, Bulgaria).

2.2. Prosedur Penelitian

2.2.1 Penyiapan Senyawa Uji dan Senyawa Pembanding

Struktur 3D senyawa uji dan senyawa pembanding dimodelkan menggunakan program GaussView 5.0. Senyawa uji yang dimodelkan adalah 18 senyawa yang terkandung dalam buah tin, yaitu angelisin, aristolon, asam klorogenat, bergapten, β -amirin, β -sitosterol, kampesterol, metoksalen, nikotiflorin, pimpinellin, psoralen, rutaretin, rutin, seselin, sianidin 3-O-rutinosida, stigmasterol, (-)-epikatekin, dan (+)-katekin. Adapun senyawa pembanding yang digunakan adalah nevirapine, efavirenz, dan doravirin.

Optimasi geometri struktur 3D senyawa uji dan senyawa pembanding yang telah dibuat dilakukan dengan program Gaussian

09W. Teori yang digunakan adalah *Density Functional Theory* (DFT) dan B3LYP dengan basis set 6-31G. Hasil dari proses optimasi geometri berupa file dengan ekstensi .log yang selanjutnya dikonversi menjadi format .mol2.

2.2.2 Struktur Tiga Dimensi Protein Target

Struktur kristal protein target HIV-1 RT (PDB ID: 3LAL) diunduh melalui RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

2.2.3 Preparasi Protein Target

Protein target dipreparasi terlebih dahulu menggunakan program Discovery Studio v.4.0. Preparasi dilakukan dengan cara memisahkan ligan alami dan protein target, menghilangkan molekul air dari protein target, menghilangkan molekul lain yang tidak digunakan, dan memilih daerah protein yang akan dijadikan target untuk penambatan molekul.

2.2.4 Validasi Penambatan Molekul

Dilakukan validasi penambatan molekul dengan menambatkan ulang (*redocking*) molekul ligan alami 3-*[[3-ethyl-5-(1-methylethyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl]carbonyl]-5-methylbenzotrile* (KRV) kepada protein target menggunakan program AutoDock v.4.2.6. Hasilnya diperoleh nilai *root mean square deviation* (RMSD) yang dapat digunakan sebagai parameter validasi. Proses validasi dinyatakan berhasil apabila diperoleh nilai RMSD < 2 Å pada *cluster* dengan anggota terbanyak.

2.2.5 Studi Interaksi secara *In Silico* dengan Penambatan Molekul

Studi interaksi secara *in silico* dilakukan dengan menambatkan senyawa uji dan senyawa pembanding yang telah dioptimasi ke protein target HIV-1 RT menggunakan program AutoDock v.4.2.6. Pengaturan ukuran *gridbox*, *grid spacing*, dan koordinat yang digunakan sama dengan pengaturan pada validasi penambatan molekul. Digunakan ukuran *gridbox* x = 50, y = 50, dan z = 50, koordinat x = 9,429, y = 13,086, dan z =

18,186, serta *grid spacing* = 0,475 Å.

2.3.1. Analisis Hasil Penambatan Molekul

Analisis hasil penambatan molekul dilakukan menggunakan konformasi terbaik ligan hasil penambatan molekul yang dipilih dengan cara menentukan konformasi ligan yang memiliki energi bebas ikatan paling rendah pada kluster terbanyak. Setelah itu dilakukan analisis dengan membandingkan interaksi senyawa uji dengan protein target terhadap interaksi senyawa pembanding dengan protein target. Senyawa yang interaksinya paling menyerupai senyawa pembanding pada masing-masing protein ditentukan.

2.2.6 Prediksi Toksisitas secara *In Silico* dengan ECOSAR

Prediksi toksisitas senyawa uji dan senyawa pembanding dilakukan menggunakan program ECOSAR v2.0. Kode SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) atau nomor CAS (*Chemical Abstracts Service*) senyawa uji serta pembanding yang diperoleh dari situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dimasukkan pada mesin pencari di program ECOSAR. Program ECOSAR akan menampilkan nilai LC50 (50% *lethal concentration*) untuk toksisitas akut pada organisme ikan dan daphnid serta nilai EC50 (50% *effective concentration*) untuk toksisitas akut pada organisme alga hijau serta nilai ChV (*chronic value*) toksisitas kronis pada organisme ikan, daphnid, dan alga hijau.

2.2.7 Prediksi Toksisitas secara *In Silico* dengan Toxtree

Prediksi toksisitas senyawa uji dan senyawa pembanding dilakukan menggunakan program Toxtree v3.1.0. Kode SMILES atau nomor CAS senyawa uji serta pembanding yang diperoleh dari situs Pubchem, dibuat tabel pada Ms Excel, kemudian disimpan dengan ekstensi file .txt. File tersebut dibuka pada program Toxtree kemudian dipilih metode yang akan digunakan. Metode analisis toksisitas pada program Toxtree yang digunakan adalah

Cramer rules, START Biodegradability, Skin irritation/ skin corrotion, Carcinogenicity (genotoxic and nongenotoxic) and mutagenicity rulebase by ISS. Masing-masing senyawa akan dikategorikan ke dalam beberapa kelas berdasarkan parameter dari metode yang digunakan.

3. Hasil

3.1. Hasil Validasi Penambatan Molekul

Dari proses validasi penambatan molekul yang dilakukan, diperoleh nilai energi bebas ikatan -10,70 kkal/mol, konstanta inhibisi 14,26 nM, dan RMSD 1,447 Å. Hasil penambatan molekul senyawa uji dan senyawa pembanding tertera pada Tabel 1. Berdasarkan data tersebut, senyawa uji yang memiliki energi bebas ikatan paling rendah adalah senyawa β -sitosterol sebesar -12,35 kkal/mol. Interaksi senyawa uji

dan senyawa pembanding hasil penambatan molekul divisualisasikan menggunakan program Discovery Studio.

3.2. Hasil Penambatan Molekul dan Analisisnya

Interaksi senyawa pembanding nevirapin, efavirenz, dan doravirin dengan protein HIV-1 RT dapat dilihat pada Tabel 2 beserta visualisasinya pada Gambar 1. Interaksi yang sama pada ketiga pembanding tersebut adalah VAL106, LYS103, LEU100, dan LEU234 pada interaksi hidrofobik, serta HIS235 pada interaksi van der waals. Interaksi senyawa uji dibandingkan terhadap interaksi tersebut, diperoleh hasil pada Tabel 3. Berdasarkan data tersebut, senyawa uji yang memiliki interaksi paling mirip dengan interaksi pembanding pada protein HIV-RT adalah senyawa kampesterol.

Tabel 1. Hasil Penambatan Molekul Senyawa Uji dan Pembanding pada Protein HIV-1 RT

Senyawa	Energi Bebas Ikatan (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (nM)
Ligan KRV	-10,70	0,01 x 10 ⁵
(-)-Epikatekin	-7,97	0,01 x 10 ⁵
(+)-Katekin	-7,40	0,04 x 10 ⁵
Angelisin	-6,85	0,09 x 10 ⁵
Aristolon	-8,68	430,90
Asam Klorogenat	-6,65	0,13 x 10 ⁵
Bergapten	-7,12	0,06 x 10 ⁵
β -Amirin	-7,33	0,04 x 10 ⁵
β -Sitosterol	-12,35	0,88
Kampesterol	-11,60	3,13
Metoksalen	-7,30	0,04 x 10 ⁵
Nikotiflorin	-6,72	0,12 x 10 ⁵
Pimpinellin	-7,31	0,04 x 10 ⁵
Psoralen	-6,88	0,09 x 10 ⁵
Rutaretin	-7,12	0,06 x 10 ⁵
Rutin	-6,98	0,08 x 10 ⁵
Seselin	-8,83	338,83
Sianidin 3-O-rutinosida	-6,94	0,08 x 10 ⁵
Stigmasterol	-8,08	0,01 x 10 ⁵
Nevirapin	-8,20	970,37
Efavirenz	-8,59	502,94
Doravirin	-10,68	14,77

Berdasarkan visualisasi hasil penambatan molekul (Gambar 2), senyawa kampesterol memiliki 4 interaksi hidrofobik yang sama dengan pembanding pada LEU234 (1 interaksi), LYS103 (2 interaksi), LEU100 (2 interaksi), dan VAL106 (5 interaksi). Sedangkan senyawa β -Sitosterol hanya memiliki 3 interaksi hidrofobik yang sama dengan pembanding pada VAL106 (4 interaksi), LEU234 (2 interaksi), dan LEU100 (3 interaksi).

3.3. Hasil Uji Toksisitas ECOSAR dan Toxtree

Berdasarkan uji toksisitas akuatik menggunakan program ECOSAR, senyawa kampesterol dan β -Sitosterol diklasifikasikan dalam toksisitas rendah, pembanding nevirapin dan efavirenz termasuk toksisitas tinggi, sedangkan pembanding doravirin termasuk toksisitas sedang.

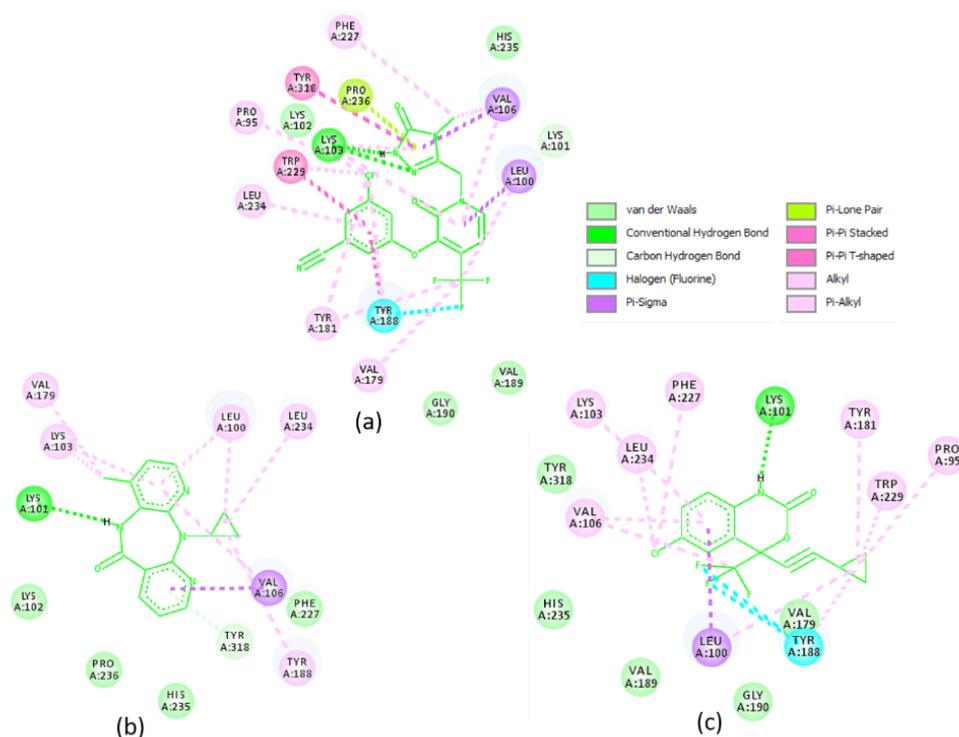
Pada uji toksisitas menggunakan program Toxtree, *Cramer Rules* mengklasifikasikan senyawa-senyawa tersebut ke dalam toksisitas tinggi. Menurut *Benigni/Bossa rulebase*, senyawa-senyawa

tersebut diprediksi tidak bersifat karsinogen genotoksik dan nongenotoksik, kecuali pembanding doravirin diprediksi bersifat karsinogen nongenotoksik. Berdasarkan klasifikasi *START Biodegradability* dan *Skin irritation/skin corrosion*, senyawa-senyawa tersebut diprediksi merupakan senyawa yang sulit mengalami biodegradasi dan tidak korosif.

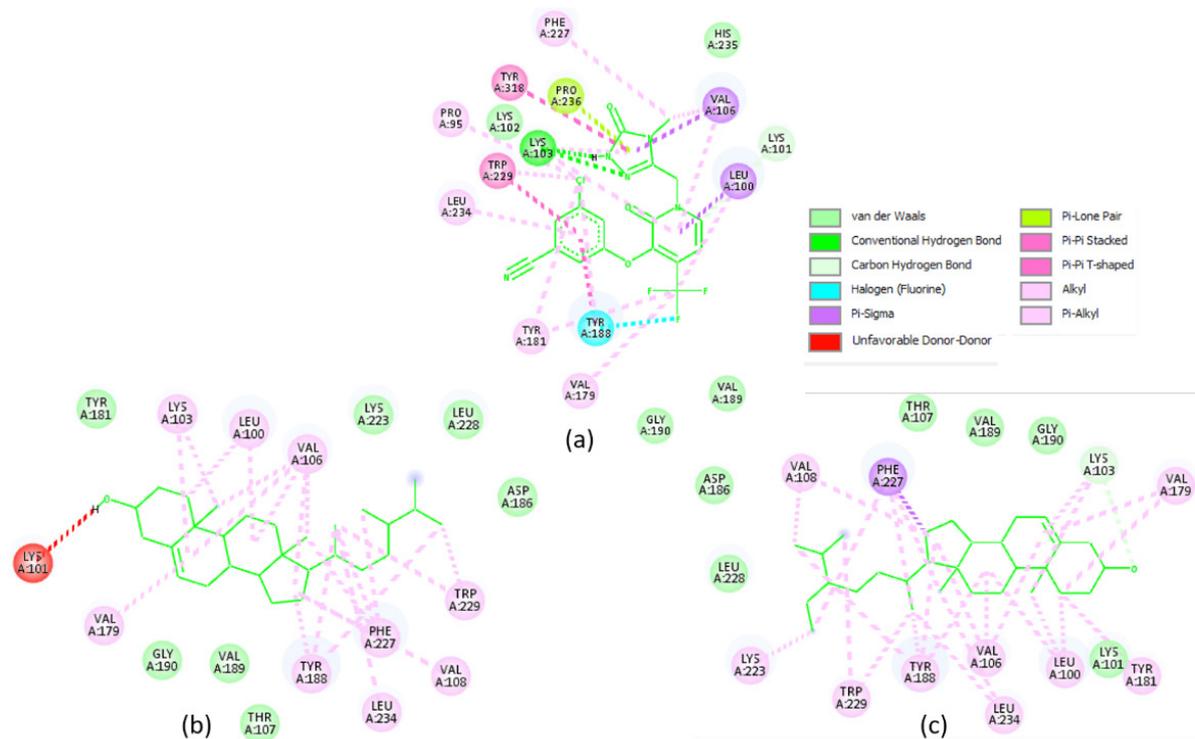
4. Pembahasan

Pada penelitian ini, dilakukan studi interaksi dengan menambatkan beberapa senyawa bahan alam yang terkandung dalam buah tin (*Ficus carica* L.) dengan protein target HIV-1 *reverse transcriptase* (PDB ID: 3LAL) karena protein tersebut berperan untuk mengubah genom RNA untai tunggal menjadi salinan DNA untai ganda dengan mengatalisis polimerisasi DNA dan pembelahan RNase H.⁹ Apabila protein tersebut dihambat, HIV tidak dapat mengubah RNA virus menjadi DNA dan tidak dapat mengintegrasikan materi genetiknya ke dalam sel inang sehingga replikasi virus tidak terjadi.

Penambatan molekul dilakukan untuk



Gambar 1. Interaksi pembanding doravirin (a), interaksi pembanding nevirapin (b), interaksi pembanding efavirenz (c) dengan HIV-1 RT.



Gambar 2. Interaksi pembanding doravirin (a), senyawa kampesterol (b), dan senyawa β -Sitosterol dengan HIV-1 RT.

memodelkan interaksi antara molekul kecil (ligan) dengan protein pada tingkat atom dan mengarakterisasi perilaku ligan di situs pengikatan protein target. Proses penambatan molekul melibatkan dua langkah dasar, yaitu prediksi konformasi, posisi, dan orientasi ligan di dalam situs-situs pengikatan protein target (pose ligan) serta prediksi nilai afinitas pengikatan.¹⁰ Pada proses penambatan molekul, biasanya protein dianggap rigid/kaku sedangkan ligan dianggap fleksibel (bebas bergerak). Selain itu, proses penambatan molekul dilakukan dalam kondisi tanpa air dan tidak sesuai dengan kondisi lingkungan tubuh.¹¹

Tahapan dalam proses penambatan molekul meliputi penentuan dan pemodelan senyawa kandidat, penentuan dan preparasi protein target, validasi proses penambatan molekul, penambatan molekul senyawa kandidat dan pembanding, penentuan pose ligan terbaik, visualisasi hasil penambatan molekul, dan analisis hasil penambatan molekul.

Di antara program yang dapat digunakan untuk penambatan molekul adalah Autodock, cDock, FLIPdock, GOLD, Glide, iDock,

SwissDock, Pyrx, dll. Program Autodock banyak digunakan untuk penambatan molekul karena merupakan program yang mudah diperoleh secara gratis.

Algoritma pencarian konformasi terbaik ligan pada sisi aktif target pada program Autodock menggunakan algoritma genetik yang mensimulasikan teori evolusi Darwin. Parameter model yang mewakili derajat kebebasan ligan dikode dalam gen. Gen-gen tersebut menyusun suatu kromosom yang mewakili pose ligan. Kromosom diubah secara acak dengan algoritma mutasi dan persilangan. Perubahan acak dan pertukaran gen menghasilkan pose ligan baru.¹²

4.1. Hasil Validasi Penambatan Molekul

Sebelum dilakukan penambatan senyawa uji dan pembanding ke protein target, dilakukan proses validasi penambatan molekul terlebih dahulu dengan cara menambatkan kembali ligan alami ke protein target. Validasi penambatan molekul dilakukan untuk mengukur tingkat kesahihan metode penambatan molekul yang digunakan. Parameter validasi penambatan molekul adalah nilai RMSD (*Root Mean Square*

Table 2. Hasil Perbandingan Interaksi Senyawa Uji terhadap Senyawa Pembanding

Senyawa	Interaksi hidrofobik		Interaksi van der waals	
	Asam amino	Jumlah	Asam amino	Jumlah
(-)-Epikatekin	LEU100			
	LYS103	3	-	0
	VAL106			
(+) -Katekin	LEU100			
	LYS103	3	HIS235	1
	VAL106			
Angelisin	VAL106	1	-	0
Aristolon	LEU100			
	VAL106	3	-	0
	LEU234			
Asam Klorogenat	-	0	-	0
Bergapten	VAL106	1	-	0
β -Amirin	-	0	-	0
β -Sitosterol	LEU100			
	VAL106	3	-	0
	LEU234			
Kampesterol	LEU100			
	LYS103	4	-	0
	VAL106			
Metoksalen	LEU234			
	VAL106	1	-	0
	-	0	-	0
Nikotiflorin	-	0	-	0
Pimpinellin	VAL106	1	-	0
Psoralen	VAL106	1	-	0
Rutaretin	VAL106	1	-	0
Rutin	-	0	-	0
Seselin	VAL106	2	-	0
	LEU234			
	LEU100			
Sianidin3-O-rutinosida	VAL106	3	HIS235	1
	LEU234			
Stigmasterol	LEU100	1	-	0

Deviation) yang menunjukkan perbedaan jarak pose ligan alami sebelum dan setelah redocking. Proses validasi dinyatakan berhasil apabila program mampu mengembalikan pose ligan hasil *redocking* ke pose semula dengan nilai RMSD < 2 Å.¹³ Proses validasi yang dilakukan dinyatakan telah valid karena diperoleh nilai RMSD sebesar 1,447 Å.

4.2. Analisis Hasil Penambatan Molekul

Setelah metode penambatan molekul tervalidasi, dilakukan studi interaksi senyawa

uji yang terkandung dalam buah tin dengan masing-masing protein target. Senyawa uji dan senyawa pembanding ditambatkan pada protein target kemudian hasilnya dianalisis. Analisis hasil penambatan molekul yang dilakukan berupa perbandingan interaksi senyawa uji dengan protein target terhadap interaksi senyawa pembanding dengan protein target. Digunakan senyawa pembanding berupa obat yang secara klinis atau secara *in vivo* atau secara *in vitro* memiliki efek antivirus yang bekerja secara

spesifik pada protein target. Pada penelitian ini, digunakan senyawa pembanding berupa obat antiretrovirus dengan mekanisme inhibisi protein reverse transcriptase yang telah disetujui *Food and Drug Administration* (FDA), yaitu nevirapin, efavirenz, dan doravirin.

Hasil penambatan molekul akan memberikan konformasi-konformasi ligan di situs aktif protein yang berada dalam gridbox kemudian memberi peringkat konformasi tersebut melalui *scoring function*. Tujuan

dari *scoring function* adalah untuk mencari pose ligan yang benar di antara pose ligan yang salah. Program Autodock menggunakan fungsi skoring berbasis medan gaya, yaitu fungsi yang menyatakan energi sistem dihasilkan dari jumlah energi penyusunnya seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi van der waals, interaksi elektrostatik, gaya torsi, dll berdasarkan prinsip-prinsip fisika. Kelemahan fungsi tersebut adalah tidak mempertimbangkan adanya pelarut yang dapat mempengaruhi interaksi ligan

Table 3. Interaksi Senyawa Pembanding dengan Protein HIV-1 RT

Senyawa	Ikatan hidrogen	Interaksi hidrofobik			Interaksi van der waals	Interaksi lain	
		Pi-sigma	Pi-alkil/ Alkil	Pi-Pi		Halogen	Pi-lone pair
Nevirapin	LYS101	VAL106	LEU100	TYR318	LYS102 PHE227 HIS235 PRO236	-	-
			LYS103				
			VAL179				
			TYR188				
			LEU234				
			PRO95				
Efavirenz	LYS100	LEU100	VAL106	-	VAL179 VAL189 HIS235 TYR318	TYR188	-
			TYR181				
			PHE227				
			TRP229				
			LEU234				
			PRO95				
Doravirin	LYS103	LEU100 VAL106	VAL179	TYR188 TRP229 TYR318	LYS102 VAL189 GLY190 HIS235	TYR188	PRO236
			TYR181				
			TYR188				
			PHE227				
			TRP229				
			LEU234				

dengan target.¹⁴

Hasil penambatan molekul senyawa uji dan senyawa pembanding tertera pada tabel 1. Dari hasil penambatan molekul, diperoleh nilai energi bebas ikatan pembanding nevirapin, efavirenz, dan doravirin sebesar -8,20, -8,59, dan -10,68 kkal/mol. Nilai energi bebas ikatan senyawa uji yang paling rendah adalah senyawa β -Sitosterol sebesar -12,35 kkal/mol. Senyawa uji β -Sitosterol memiliki nilai energi bebas ikatan yang lebih rendah dari ketiga pembanding. Untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas inhibisi protein terbaik, diperlukan analisis interaksi hasil penambatan molekul.

Interaksi senyawa uji dan senyawa pembanding hasil penambatan molekul dengan protein divisualisasikan menggunakan program Discovery Studio. Interaksi yang terjadi antara ligan dan protein dapat berupa ikatan hidrogen, seperti ikatan hidrogen konvensional, ikatan karbon hidrogen, dan ikatan pi-donor, interaksi hidrofobik seperti pi-alkil, alkil, pi-sigma, pi-pi *T-shaped*, dan pi-pi *stacked*, interaksi elektrostatik, seperti jembatan garam, pi-kation, dan pi-anion, serta interaksi lainnya, seperti interaksi halogen dan *pi-lone pair*.

Dibandingkan hasil visualisasi senyawa uji dan senyawa pembanding dengan melihat interaksi yang sama pada residu asam amino yang sama. Apabila digunakan pembanding >1 maka dianalisis terlebih dahulu interaksi yang sama pada seluruh senyawa pembanding kemudian hasilnya dibandingkan dengan interaksi senyawa uji. Interaksi yang sama pada seluruh pembanding dapat menunjukkan interaksi yang memberikan efek karena interaksi yang memberikan efek terdapat pada semua obat.

Pada Gambar 1, senyawa pembanding doravirin memiliki 1 ikatan hidrogen konvensional pada LYS103, 13 interaksi pi-alkil/alkil pada VAL179 (1 interaksi), TYR181 (2 interaksi), LEU234 (1 interaksi), PRO95 (1 interaksi), PHE227 (1 interaksi), LEU100 (1 interaksi), VAL106 (2 interaksi), TYR188 (1 interaksi), LYS103 (2 interaksi), dan TRP229 (1 interaksi), 1 ikatan halogen pada TYR188, 2 interaksi pi-pi *stacked* pada

TYR188 dan TYR318, 2 interaksi pi-pi *T-shaped* pada TRP229, 1 interaksi *pi-lone pair* pada PRO236, serta 3 interaksi van der Waals pada TYR318, TRP229, dan TYR188.

Senyawa pembanding nevirapin memiliki 1 ikatan hidrogen konvensional pada LYS101, 1 ikatan pi-sigma pada VAL106, 8 ikatan pi-alkil/alkil pada TYR188, LYS103 (2 interaksi), VAL179, LEU100 (2 interaksi), LEU234, dan VAL106, serta 4 interaksi van der Waals pada PHE227, HIS235, PRO236, dan LYS102.

Sedangkan senyawa pembanding efavirenz memiliki 1 ikatan hidrogen konvensional pada LYS100 (1,91843 Å), 10 ikatan pi-alkil/alkil pada VAL106 (2 interaksi), VAL100, TYR188, LYS103, LEU234, PHE227, TYR181, TRP229, dan PRO95, 2 ikatan halogen pada TYR188, dan 5 interaksi van der Waals pada VAL179, GLY190, VAL189, HIS235, dan TYR318.

Interaksi yang sama pada ketiga pembanding tersebut adalah VAL106, LYS103, LEU100, dan LEU234 pada interaksi hidrofobik dan HIS235 pada interaksi van der Waals seperti yang tertera pada Tabel 2. Pembanding doravirin memiliki energi bebas ikatan sebesar -10,68 kkal/mol yang lebih rendah dari nevirapin dan efavirenz dengan energi bebas ikatan -8,20 dan -8,59 kkal/mol. Hal tersebut disebabkan oleh interaksi hidrofobik pada pembanding doravirin lebih banyak dengan jumlah 17 interaksi.

Pada Tabel 3, senyawa uji yang memiliki interaksi paling mirip dengan interaksi ketiga pembanding (nevirapin, efavirenz, dan doravirin) pada protein HIV-RT adalah senyawa kampesterol dengan 4 interaksi hidrofobik pada LEU234, LYS103 (2 interaksi), LEU100 (2 interaksi), dan VAL106 (5 interaksi). Interaksi yang sama pada senyawa uji kampesterol dan ketiga pembanding menunjukkan interaksi senyawa-senyawa tersebut berada di situs yang sama pada protein HIV-1 RT dengan kekuatan interaksi yang serupa sehingga dapat diprediksi senyawa uji kampesterol memiliki aktivitas inhibisi terhadap protein HIV-1 RT.

Pembanding doravirin memiliki energi bebas ikatan sebesar -10,68 kkal/mol,

sedangkan senyawa kampesterol memiliki energi bebas ikatan yang lebih rendah yaitu sebesar -11,60 kkal/mol. Hal tersebut sesuai dengan hasil yang ditunjukkan pada Gambar 2, dimana senyawa kampesterol memiliki interaksi hidrofobik lebih banyak dari perbandingan doravirin.

Adapun senyawa β -Sitosterol memiliki nilai energi bebas ikatan yang paling

rendah, yaitu sebesar -12,35 kkal/mol karena memiliki interaksi hidrofobik yang lebih banyak sejumlah 27 interaksi. 27 interaksi tersebut adalah 26 interaksi pi-alkil/alkil pada VAL179 (2 interaksi), VAL108 (2 interaksi), LYS223 (1 interaksi), TRP229 (2 interaksi), TYR188 (4 interaksi), VAL106 (4 interaksi), LEU234 (2 interaksi), LEU100 (3 interaksi), serta 1 interaksi pi-sigma pada PHE227. Namun senyawa β -Sitosterol memiliki kemiripan interaksi dengan perbandingan yang lebih sedikit dari senyawa kampesterol, yaitu 3 interaksi hidrofobik pada VAL106, LEU234, dan LEU100.

4.3. Analisis Toksisitas

Toksisitas adalah ukuran dari kumpulan efek bahan kimia yang tidak diinginkan atau merugikan. Derajat toksisitas suatu senyawa dapat bersifat kuantitatif (seperti LD50, EC50, ChV, dll) dan kualitatif baik secara *binary* (seperti toksik atau tidak toksik) atau secara *ordinary* (seperti toksisitas rendah, sedang, atau tinggi). Uji toksisitas bertujuan untuk mengidentifikasi efek berbahaya suatu senyawa pada manusia, hewan, tanaman, atau lingkungan melalui paparan akut atau paparan kronis. Adapun prediksi toksisitas secara *in silico* bertujuan untuk melengkapi uji toksisitas secara *in vitro* dan *in vivo* dengan keuntungan dapat mengurangi kebutuhan hewan uji, mengurangi biaya dan waktu, meningkatkan prediksi toksisitas dan penilaian keamanan, serta dapat memperkirakan toksisitas zat kimia sebelum disintesis.¹⁵

Prediksi toksisitas menggunakan ECOSAR v2.0 dilakukan untuk memprediksi toksisitas akut dan kronis pada komunitas perairan umum. *Environmental Protection Agency* (EPA) telah memfokuskan model toksisitas perairan untuk organisme air tawar

karena sebagian besar pelepasan bahan kimia industri masuk ke dalam air tawar. Toksisitas akut merupakan efek toksik organisme air tawar setelah paparan jangka pendek suatu senyawa yang dapat dianalisis dari nilai LC50 (*Lethal Concentration*) organisme ikan selama 96 jam, LC50 organisme daphnid 48 jam, dan EC50 (*Effect Concentration*) organisme alga hijau selama 96 jam. Sedangkan toksisitas kronik merupakan efek toksik organisme air tawar setelah paparan jangka panjang suatu senyawa yang dapat dianalisis dari nilai ChV (*Chronic Value*) pada organisme ikan, daphnid, dan alga hijau.

Parameter yang harus diperhatikan dalam analisis toksisitas dengan program ECOSAR adalah berat molekul, nilai logKow, dan kelarutan dalam air. ECOSAR memiliki batas maksimum nilai logKow untuk setiap QSAR yang digunakan. Jika log Kow melebihi batas, terjadi "*no effect at saturation*" (tidak ada efek saat jenuh) selama durasi paparan yaitu tidak teramati adanya efek toksisitas karena telah terjadi kejenuhan.

Kelarutan dalam air suatu senyawa harus dibandingkan dengan nilai toksisitas yang diperoleh, apabila nilai toksisitas secara signifikan lebih besar dari kelarutan dalam air maka terjadi *no effect at saturation* (NES). Apabila efek konsentrasi di bawah kelarutan dalam air maka hasil prediksi toksisitas diklasifikasikan berdasarkan nilai LC50 atau EC50 pada toksisitas akut dan nilai ChV pada toksisitas kronik. Jika efek konsentrasi $\geq 10x$ di atas kelarutan dalam air maka tidak ada efek saat jenuh (*low concern*) dan jika efek konsentrasi $< 10x$ di atas kelarutan dalam air maka tidak ada efek saat jenuh atau dapat terjadi efek.¹⁶

Berdasarkan data hasil uji toksisitas akuatik menggunakan ECOSAR (Tabel 4), diperoleh bahwa senyawa kampesterol dan β -Sitosterol memiliki nilai logKow melebihi batas maksimum logKow sehingga terjadi "*no effect at saturation*" di mana senyawa-senyawa tersebut tidak cukup larut dalam air sehingga efek toksisitasnya tidak teramati. Oleh karena itu, kedua senyawa tersebut termasuk dalam kategori *low concern* atau memiliki toksisitas rendah (cukup aman)

pada organisme air.

Senyawa pembanding nevirapin dan efavirenz termasuk dalam klasifikasi toksisitas *high concern* karena memiliki nilai LC50 atau EC50 pada toksisitas akut < 1 mg/L atau memiliki nilai ChV pada toksisitas kronik < 0,1 mg/L. Kedua senyawa tersebut memiliki toksisitas yang tinggi pada organisme air sehingga pembuangan limbah kimia ke perairan perlu diperhatikan. Diperlukan uji toksisitas lebih lanjut untuk mengetahui apakah keempat senyawa tersebut memiliki toksisitas yang tinggi juga pada manusia. Adapun senyawa doravirin dikategorikan dalam *moderate concern* karena memiliki nilai LC50 atau EC50 pada toksisitas akut > 1 dan < 100 mg/L atau memiliki nilai ChV pada toksisitas kronik > 0,1 dan < 10 mg/L. Prediksi toksisitas juga dilakukan pada senyawa uji menggunakan program Toxtree.

Parameter yang digunakan untuk prediksi toksisitas tersebut adalah *Cramer rules*, *START Biodegradability*, *Skin irritation/skin corrosion*, *Carcinogenicity (genotox and nongenotox)* dan *mutagenicity rulebase* by ISS. Hasil uji analisis toksisitas dengan program Toxtree tertera pada Tabel 4.

Berdasarkan *Cramer rules*, toksisitas

suatu senyawa dikategorikan menjadi 3 kelas yaitu toksisitas rendah (kelas 1), toksisitas sedang (kelas 2) dan toksisitas tinggi (kelas 3). Senyawa yang diuji termasuk dalam kelas 3 karena pada nevirapin cincin heterosiklik dengan substituen kompleks, pada efavirenz terdapat elemen selain C, H, O, N, dan S divalent, dan pada doravirin memiliki gugus fungsi yang dapat meningkatkan toksisitas. Senyawa kampesterol dan β -Sitosterol termasuk dalam kelas 3 namun pada program Toxtree tidak teridentifikasi adanya struktur yang mengkategorikan kedua senyawa tersebut ke dalam kelas 3.

Berdasarkan parameter *START Biodegradability*, senyawa dalam kelas 1 merupakan senyawa yang mudah dibiodegradasi, kelas 2 merupakan senyawa *persistent*, dan kelas 3 merupakan senyawa yang belum diketahui biodegradabilitasnya. Diketahui senyawa yang diuji merupakan senyawa *persistent* yaitu senyawa yang relatif bertahan lama di lingkungan karena memiliki 2 atau lebih cincin.

Menurut parameter *Skin irritation/skin corrosion*, senyawa uji dikategorikan menjadi 7 kelas, yaitu tidak korosif pada kulit (kelas 1), tidak mengiritasi atau korosif

Table 4. Hasil Analisis Uji Toksisitas dengan Program ECOSAR dan Toxtree

Senyawa	Toksisitas akuatik	Cramer rules	Skin irritation	START biodegradability	Benign/Bossa rulebase	
					Genotoxic carcinogenicity	Nongenotoxic carcinogenicity
Kampesterol	<i>Low concern</i>	Kelas 3	Tidak korosif	<i>Persistent</i>	Negatif	Negatif
β -Sitosterol	<i>Low concern</i>	Kelas 3	Tidak korosif	<i>Persistent</i>	Negatif	Negatif
Nevirapin	<i>High concern</i>	Kelas 3	Tidak korosif	<i>Persistent</i>	Negatif	Negatif
Efavirenz	<i>High concern</i>	Kelas 3	Tidak korosif	<i>Persistent</i>	Negatif	Negatif
Doravirin	<i>Moderate concern</i>	Kelas 3	Tidak korosif	<i>Persistent</i>	Negatif	<i>Structural alert</i>

pada kulit (kelas 2), tidak mengiritasi (kelas 3), mengiritasi kulit (kelas 4), korosif pada kulit (kelas 5), mengiritasi atau korosif pada kulit (kelas 6), dan tidak diketahui sifat iritasi atau korosifnya pada kulit (kelas 7). Senyawa yang diuji termasuk dalam kelas 1, yaitu tidak korosif karena memiliki berat molekul > 350 g/mol.

Berdasarkan *carcinogenicity (genotox and nongenotox)* dan *mutagenicity rulebase by ISS*, senyawa uji diklasifikasikan ke dalam 10 kelas yaitu struktur alert untuk karsinogen genotoksik (kelas 1), struktur alert untuk karsinogen nongenotoksik (kelas 2), berpotensi mutagen *Salmonella typhimurium* TA100 berdasarkan QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) (kelas 3), tidak berpotensi mutagen *Salmonella typhimurium* TA100 berdasarkan QSAR (kelas 4), berpotensi karsinogen berdasarkan QSAR (kelas 5), tidak berpotensi karsinogen berdasarkan QSAR (kelas 6), untuk penilaian lebih baik dapat diterapkan perhitungan QSAR (kelas 7), negatif karsinogen genotoksik (kelas 8), negatif karsinogen nongenotoksik (kelas 9), *error* ketika diterapkan *decision tree* (kelas 10).

Senyawa doravirin termasuk dalam kelas 2 dan 8 karena memiliki gugus benzen terhalogenasi, sementara senyawa lainnya termasuk dalam kelas 8 dan 9 karena tidak memiliki struktur yang dapat meningkatkan potensi karsinogen genotoksik dan nongenotoksik.

5. Simpulan

Hasil studi interaksi senyawa yang terkandung dalam buah tin dan protein target HIV-1 RT menggunakan program Autodock menunjukkan bahwa senyawa yang interaksinya paling menyerupai senyawa pembanding adalah kampesterol dengan 4 interaksi hidrofobik pada LEU234, LYS103, LEU100, dan VAL106. Berdasarkan klasifikasi *Cramer Rules* untuk uji toksisitas, senyawa kampesterol diklasifikasikan dalam kelas 3 (toksisitas tinggi) dan berdasarkan klasifikasi *Benigni/Bossa Rulebase*, senyawa kampesterol tidak bersifat karsinogen genotoksik dan nongenotoksik. Senyawa

kampesterol menunjukkan toksisitas yang rendah pada organisme air. Senyawa tersebut berpotensi baik untuk menjadi dasar pengembangan obat anti HIV.

Daftar Pustaka

1. Denaro M, Smeriglio A, Barreca D, Francesco CD, Occhiuto C, Milano G, Trombetta D. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: an update. *Phytother Res.* 2020;34(4):742-768.
2. Badgular SB, Patel VV, Bandivdekar AH, Mahajan RT, Bandivdekar AH, Mahajan RT. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. *Pharm Biol.* 2014;52(11):1487-1503.
3. Mawa S, Husain K, Jantan I. *Ficus carica* L. (moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013:1-8.
4. Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Bonesi M, Duez P, Menichini F, Conforti F. Changes in the phenolic and lipophilic composition, in the enzyme inhibition and antiproliferative activity of *Ficus carica* L. cultivar Dottato fruits during maturation. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):726-733.
5. Loizzo MR, Bonesi M, Pugliese A, Menichini F, Tundis R. Chemical composition and bioactivity of dried fruits and honey of *Ficus carica* cultivars Dottato, San Francesco and Citrullara. *J Sci Food Agric.* 2014;94(11):2179-2186.
6. Yuliandra Y, Nosa US, Raveinal R, Almasdy D. Terapi antiretrovirus pada pasien HIV/AIDS di RSUP. Dr. D. Djamil Padang: kajian sosiodemografi dan evaluasi obat. *J Sains Farm Klin.* 2017;4(1):1-8.
7. Magiorkinis G, Angelis K, Mamais I. The global spread of HIV-1 subtype B epidemic. *Infect Genet Evol.* 2016;46:169-179.
8. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):1-23.
9. Seal A, Aykkal R, Babu RO, Ghosh

- MG. Docking Study of HIV-1 Reverse Transcriptase with Phytochemicals. *Bioinformation*. 2011;5(10):430-439.
10. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2010;7(2):146-157.
11. Pantsar T, Poso A. Binding affinity via docking: fact and fiction. *Molecules*. 2018;23(8):1-11.
12. Guan B, Zhang C, Ning J. Genetic Algorithm with a crossover elitist preservation mechanism for protein–ligand docking. *AMB Express*. 2017;7(1):174.
13. Bursulaya BD, Totrov M, Abagyan R, Brooks CL. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *J Comput Aided Mol Des*. 2003;17(11):755–763.
14. Huang SY, Grinter SZ, Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(40): 12899–12908.
15. Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2016;6:147-172.
16. Mayo-Bean K, Moran K, Meylan B, Ranslow P. Methodology document for the ecological structure-activity relationship model (ECOSAR) class program. New York: US Environ Prot Agency; 2012.