

Eksplorasi Senyawa Antiretroviral dari Biji Tanaman *Calophyllum inophyllum L.* sebagai Alternatif Obat AIDS secara *In Silico*

Exploration of Antiretroviral Compounds from *Calophyllum inophyllum L.* Plant Seeds as an *In Silico* Alternative for AIDS Drugs

Ilham Aris Wandu, Jonathan Alva Samudra, Roiyan Nur Khoirul Umam, Rina Sari Asih, Mursyidatun Nafiah, Siti Nurjanah dan Rejeki Siti Ferniah

Program Studi Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275
Corresponding Author ; Ferniah_mikro@yahoo.com

Abstract

Retroviruses are a type of positive-sense RNA virus single-stranded with DNA intermediates and as obligate parasites that target host cells. The principle of DNA replication of retrovirus is not in a regular pattern but in an inverted pattern. Therefore, a study was conducted to find candidates for natural compounds from the seeds of the plant *Calophyllum inophyllum L.* and found that the most potential as a candidate for AIDS drugs was Calophyllolid. However, further research needs to be done and needs to be considered. This is because the binding affinity number is too small. Based on the Lipinski test, Calophyllolid does not meet all Lipinski's rules so that its use as a drug will be used by injection or other means than oral. In the toxicity test, Calophyllolid has the same value as the other 3 compounds, so a special test is needed to eliminate some of the possible carcinogenicity.

Keyword : *Calophyllum inophyllum L.*, *In Silico*, *Molecular Docking*, Protein U Virus, Retroviruses

Abstrak

Retrovirus adalah jenis virus RNA sense positif beruntai tunggal dengan perantara DNA dan sebagai parasit obligat yang menargetkan sel inang. Prinsip replikasi DNA dari retrovirus tidak dengan pola biasa melainkan dengan pola terbalik. Maka dilakukan penelitian untuk mencari kandidat senyawa alami dari biji Tanaman *Calophyllum inophyllum L.* dan ditemukan yang paling berpotensi sebagai calon obat untuk AIDS adalah Calophyllolid. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dan perlu dipertimbangkan. Hal ini dikarenakan angka binding affinity yang terlalu kecil. Berdasarkan uji lipinski juga Calophyllolid tidak memenuhi semua aturan lipinski sehingga untuk penggunaannya sebagai obat nanti akan digunakan dengan cara injeksi atau cara lain selain oral. Pada uji toksisitas Calophyllolid memiliki nilai yang sama dengan 3 senyawa lainnya sehingga diperlukan uji khusus untuk menghilangkan beberapa kemungkinan karsinogenisitasnya.

Kata kunci : *Calophyllum inophyllum L.*, *In Silico*, *Molecular Docking*, Protein U virus, Retrovirus

PENDAHULUAN

Retrovirus adalah jenis virus RNA sense positif beruntai tunggal dengan perantara DNA dan sebagai parasit obligat yang menargetkan sel inang. Prinsip replikasi DNA dari retrovirus tidak dengan pola biasa melainkan dengan pola terbalik. Begitu berada di dalam sitoplasma sel inang, retrovirus menggunakan enzim reverse transcriptase sendiri untuk menghasilkan DNA dari genom RNA-nya. DNA baru ini kemudian dimasukkan ke dalam genom sel inang oleh enzim integrase. HIV (Human immunodeficiency viruses) adalah virus yang menyebabkan AIDS. Normalnya, tubuh kita memiliki sistem imun yang menyerang virus dan bakteri. Sistem kekebalan memiliki sel darah putih yang melindungi kita dari

infeksi. Sel darah putih mengandung sel CD4 + yang juga dikenal sebagai sel pembantu atau sel T. Infeksi ini memanfaatkan sistem kekebalan tubuh. Infeksi ini menyebabkan beberapa gangguan kesehatan dan bahkan menyebabkan kematian pada seseorang. HIV memiliki kemampuan untuk mendegradasi sel CD4 sehingga sel CD4 akan habis dihancurkan sel CD8 yang berfungsi menghancurkan sel yang telah terinfeksi. Produksi sel CD 4 yang tidak sebanding dengan yang dihancurkan akan mengakibatkan tubuh menjadi rentan diserang penyakit. AIDS belum ada obatnya tetapi ada obat-obatan tertentu yang digunakan untuk memperlambat penyakit agar tetap sehat dalam waktu yang lama. Tidak ada obat untuk menghilangkan penyakit ini (Qadri *et.al.*, 2016).

Tanaman nyamplung merupakan tanaman yang saat ini banyak digunakan sebagai bahan bakar nabati (BBN). Bahan bakar ini cukup baik digunakan karena mengurangi emisi gas karbonmonoksida (Budi *et al.*, 2014). Tanaman Nyamplung dilaporkan dapat menjadi antiretroviral terkhusus untuk HIV. Laure *et al.*, (2008) dalam Win (2018) melaporkan senyawa dipyrano-coumarins– calophyllolid, inophyllum B, C, G dan P yang diekstraksi dari biji dan daun Nyamplung diketahui memberikan efek terhadap penghambatan terhadap enzim reverse transcriptase non nukleocidase (NNRT). Inophyllum B and P menghambat enzim reverse transcriptase dengan nilai IC₅₀ 38 dan 130 nM. Inophyllum juga menyebabkan gangguan pertumbuhan HIV-1. Enzim NNRT sendiri adalah enzim yang dibutuhkan virus HIV untuk menjadi DNA secara utuh sehingga bisa bereplikasi dalam sel tubuh. Begitupun ekstrak campuran etanol dan air dari bagian kulit batang memberikan pengaruh signifikan sebagai anti HIV-IN karena melakukan penghambatan terhadap enzim HIV-1 integrase (Narayan *et al.*, 2011) dalam Ragasa *et al.*, 2015).

Human immunodeficiency virus tipe 1 (HIV-1) Viral protein U (Vpu) protein adalah 81-amino acid-type I transmembrane protein. Unsur-unsur urutan karakteristik bersama dengan fungsinya selama siklus hidup virus adalah tipikal untuk protein yang termasuk dalam keluarga viroporin. Secara khusus, keberadaan domain transmembran tunggal, terminal amino luminal, dan karboksyterminus sitosol dalam arsitektur protein mengklasifikasikan Vpu sebagai anggota viroporin kelas IA. Vpuprotein diterjemahkan dari mRNA bikistronik Rev-diatur yang juga mengkode *the env* gene. Jadi, selama siklus replikasi virus, protein Vpu dan protein prekursor amplop (Env) diproduksi terlambat dan tidak terkoordinasi. Protein Vpu yang diterjemahkan mengubah distribusi dan / atau konsentrasi protein membran dalam sel inang (Eugenia, 2015).

Penambatan molekul (molecular docking) adalah metode komputasi yang bertujuan meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji in-vitro. Di dalam penambatan molekul, molekul ligan ditambatkan pada situs aktif atau situs tambat dari suatu protein yang sedang diam (statik), dengan menyertakan molekul ko-faktor dan/atau molekul air di dalamnya atau tidak. Dari sini, diperoleh data mengenai posisi dan orientasi ligan-ligan itu di dalam situs aktif atau situs tambat tersebut. Dari data ini, dapat disimpulkan gugus- gugus fungsional ligan yang penting untuk interaksinya,

sehingga tidak boleh dihilangkan, dan gugus-gugus fungsionalnya yang dapat ditingkatkan kekuatan interaksinya. (Motiejunas & Wade, 2006). Berdasarkan latar belakang maka perlu dilakukan penelitian tentang “Eksplorasi Senyawa Antiretroviral dari Biji Tanaman “*Calophyllum inophyllum L.* sebagai Alternatif Obat AIDS secara In Silico”. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai alternatif obat alami untuk menekan pertumbuhan virus HIV di dalam tubuh manusia dan ramah lingkungan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2021 secara mandiri dan bersifat empiric dan dilakukan dengan metode in silico. Metode in silico merupakan metode yang menggunakan software dan bantuan kecerdasan buatan (AI) untuk membantu penelitian sebelum dilakukan penelitian secara in vivo. Penelitian ini membutuhkan waktu setidaknya 3 bulan untuk menunjukkan hasil yang signifikan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah makromolekul protein U virus yang diunduh dari situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) serta ligan Calophyllolid, ligan inophyllum B, ligan inophyllum C dan ligan inophyllum P yang diunduh dari situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop dengan spesifikasi RAM minimal 4 GB, CPU Core i5 dan kecepatan processor minimal 2,4 GHz; software PyMol; software PyRX; Lipinski Test; tools for metabolic pathway; dan software pendukung lainnya.

Preparasi molekul

Makromolekul U virus dalam bentuk PDB dapat diunduh di situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Makromolekul dibersihkan dari ligan dan dari molekul air dengan menggunakan software PyMol. File yang telah dibersihkan disimpan dalam bentuk file PDB (Protein Data Base).

Preparasi ligan

Ligan dapat diunduh di situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ligan yang diunduh dalam bentuk SDF diubah menjadi bentuk format PDB dengan menggunakan PyMol.

Proses Docking protein

Docking protein dilakukan dengan menggunakan software PyRX. Makromolekul dan ligan didocking satu persatu.

Lipinski Test

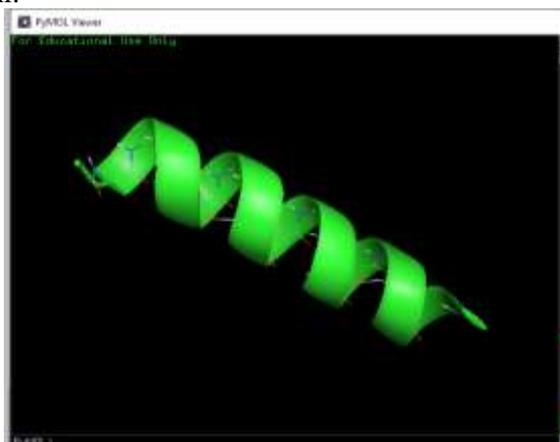
Lipinski test digunakan untuk membedakan antara drug-like dan non drug-like molecules. Metode ini juga dapat memprediksi tingkat keberhasilan suatu senyawa menjadi obat dengan minimal mengikuti 2 aturan Lipinski dari kelima aturan tersebut. Aturan Lipinski yaitu massa molekul kurang dari 500 Dalton, tinggi lipofilisitas atau LogP kurang dari 5, jumlah ikatan hydrogen donor dan akseptor masing-masing kurang dari 5 dan 10, serta reaktivitas molar harus antara 40 dan 130 (Lipinski, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

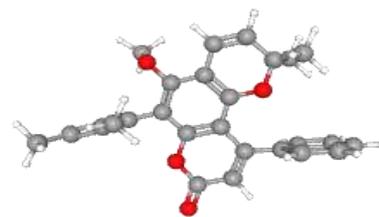
Molecular Docking

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan software PyRX sebagai alat untuk melihat *binding affinity* atau kekuatan ikatan antara makromolekul dengan ligan yang akan digunakan. Metode docking yang dilakukan adalah *blind docking*, yaitu proses docking secara menyeluruh dari setiap sisi molekul dikarenakan belum diketahui sisi aktif dari molekul tersebut. Hal ini disampaikan oleh Sharma *et.al.*, (2018) bahwa blind docking mengacu pada docking ligan ke seluruh permukaan protein tanpa pengetahuan sebelumnya tentang sisi aktif target. *Blind docking* melibatkan beberapa percobaan/berjalan dan beberapa perhitungan energi sebelum pose kompleks protein-ligan yang menguntungkan ditemukan.

Hasil dari visualisasi dari protein U virus, Calophylloid, Inophyllum B Inophyllum C, dan Inophyllum P dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



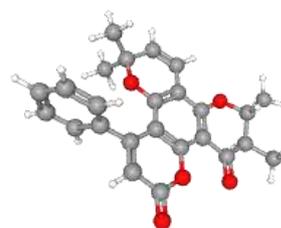
Gambar 1. Visualisasi Protein U Virus dengan PyMoL



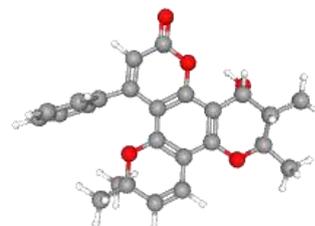
Gambar 2 Visualisasi Ligan Calophylloid



Gambar 3 Visualisasi Ligan Inophyllum B



Gambar 4 Visualisasi Ligan Inophyllum C



Gambar 5 Visualisasi Ligan Inophyllum P

Tabel 1. Hasil Molecular Docking

Ligan	<i>Binding affinity</i>
Calophylloid	-3,9
Inophyllum B	-2,7
Inophyllum C	-3,5
Inophyllum P	-3,2

Tabel diatas menunjukkan nilai binding affinity antara ligan yang digunakan dengan protein U Virus sebagai makromolekul. *Binding affinity* terbaik dinilai berdasarkan semakin negatif nilainya. Menurut pendapat Agistia dkk. (2013) semakin kecil *binding affinity* semakin kuat pula

ikatan antar ligan dan molekulnya. Berdasarkan data diatas, nilai terkecil adalah pada Calophylloid dengan binding affinity sebesar -3,9. Namun jika dibandingkan dengan beberapa penelitian, Nilai tersebut terbilang kecil. Contohnya pada penelitian Arwansyah dkk, (2014) yang beberapa hasil binding affinitynya berkisar antara -7 sampai

dengan -8,9. Jadi bisa dikatakan bahwa walau Calophylloid memiliki binding affinity yang paling kecil dari keempat ligan lainnya, tapi untuk kekuatan ikatan dengan Protein U Virus nya masih lemah.

Tabel 2. Sifat Senyawa berdasarkan Aturan Lipinski

Parameter	Ligan			
	Calophyllolide	Inophyllum B	Inophyllum C	Inophyllum P
Molecular Mass	416.000000	404.000000	402.000000	404.000000
Hydrogen Bond Donor	0	1	0	1
Hydrogen Bond Acceptor	5	5	5	5
LogP	5.378999	4.671898	4.821198	4.671898
Molar Refractivity	119.652466	113.552765	112.923470	113.552765

Uji sifat farmakologi dilakukan untuk mengkalkulasikan bioavailabilitas suatu senyawa. Metode yang digunakan adalah *Lipinski's Rule of Five*. Aturan lipinski menetapkan bahwa enyawa yang dikatakan mirip dengan obat oral harus memiliki berat molekul kurang dari 500 Da, jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, nilai logP kurang dari 5, dan molar refractivity antara 40-130 (Lipinski, dkk, 1997). Analisis senyawa dilakukan dengan menggunakan SCFBio (<http://www.scfbio-iitd.res.in/>). Analisis dilakukan dengan memasukan ligan dalam bentuk pdb,

kemudian tombol submit diklik. Hasil didapatkan kemudian disusun dalam bentuk tabel.

Berdasarkan pada tabel dapat dilihat bahwa Senyawa Calophyllolide memiliki berat molekul kurang dari 500 Da, memiliki 0 ikatan donor hidrogen, memiliki 5 ikatan akseptor hidrogen, memiliki nilai logP sebesar 5,37, dan memiliki nilai *molar refractivity* sebesar 119,652. Berdasarkan aturan lipinski senyawa calophyllolide memenuhi 4 aturan. Senyawa Inophyllum B, Inophyllum C, dan Inophyllum P memenuhi semua aturan lipinski.

Tabel 3. Uji Toksisitas menggunakan software Toxtree

Nama Ligan	Decision Tree			
	Carcinogenicity (genotox and non genotox) and mutagenecity rulebase	Skin irritation/skin corrosion	In Vitro mutagenecity (Ames test) alert by ISS	Structre alerts for the in vivo micronucleus assay in rodents
Calophyllolid	1,9	1	1	1
Inophyllum B	1,9	1	1	1
Inophyllum C	1,9	1	1	1
Inophyllum P	1,9	1	1	1

Uji toksisitas berfungsi untuk menganalisa keamanan dari senyawa yang akan digunakan sebagai obat dari segi toksinnya. Salah satu software yang dapat digunakan adalah Toxtree. Pada data dapat dilihat bahwa Calophyllolid dan tiga senyawa lainnya yaitu Inophyllum B, C, dan P untuk uji berdasarkan karsinogenisitas dan mutagenisitas mendapat angka 1 dan 9 yang berarti Calophyllolid memiliki struktur yang rawan terhadap sifat genotoksik karsinogenisitas, sedangkan angka 9 berarti negatif terhadap non genotoksik karsinogenisitas. Uji berdasarkan kekuatan iritasi atau korosi terhadap kulit mendapat angka 1 yang berarti keempat senyawa tersebut tidak bersifat korosif terhadap kulit. Angka 1 pada uji tes AMES terhadap mutagenisitas In Vitro menggunakan bakteri *S. Thypimurium* menunjukkan adanya peringatan terhadap mutagenisitas terhadap bakteri *S. thypumurium*. Pada uji Peringatan struktur untuk uji mikronukleus in vivo pada hewan pengerat didapat angka 1 yang berarti setidaknya ada satu struktur positif yang berbahaya terhadap *micronucleus assay*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa dari 4 senyawa biji tanaman Calophyllum inophyllum L. Yang paling berpotensi sebagai calon obat untuk AIDS adalah Calophyllolid. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dan perlu dipertimbangkan. Hal ini dikarenakan angka binding affinity yang terlalu kecil. Kemungkinan terbesar adalah karena tidak cocoknya ligan yang diuji dengan makromolekul yang digunakan yaitu protein U Virus. Berdasarkan uji lipinski juga Calophyllolid tidak memenuhi semua aturan lipinski sehingga untuk penggunaannya sebagai obat nanti akan digunakan dengan cara injeksi atau cara lain selain oral. Pada uji toksisitas Calophyllolid memiliki nilai yang sama dengan 3 senyawa lainnya sehingga diperlukan uji khusus untuk menghilangkan beberapa kemungkinan karsinogenisitasnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih Penulis ucapkan kepada seluruh pihak yang telah mendukung jalannya penelitian yang sudah dilaksanakan dan terima kasih kepada Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro yang telah mendanai penelitian ini sesuai dengan Surat Penugasan Pelaksanaan Penelitian Sumber Dana Selain

APBN Tahun Anggaran 2021 Nomor :/UN7.5.8.2/PP/202

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Ri., D. T. Indrawati, dan M. A. Masruhin. 2015. Aktivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia poyantha*) Sebagai Anti inflamasi Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *J. Trop. Pharm. Chem.* 3(2):120-123.
- Calles, NR., Evans, D., Terlonge, D. 2006. *HIV Curriculum for the Health Professional: Pathophysiology of The Human Immunodeficiency Virus*. Baylor College of Medicine; Texas, pp: 7-14.
- Eugenia González, María. 2015. Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. *Viruses*. ResearchGate.
- John M. Coffin, Stephen H. Hughes, and Harold E. Vermus. 1997. *Retroviruses*, Cold Spring Laboratory Press.
- Leksono, M.P., Budi, Eritrina Windyarini, Tri Maria Hasnah. 2014. *Budidaya Tanaman Nyamplung (Calophyllum Inophyllum L.) untuk Bioenergi dan Prospek Pemanfaatan Lainnya*. Bogor: IPB Press.
- Lipinski, C.A. 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 1 (4): 337-341.
- Motiejunas, D., & Wade, R.. 2006. Structural, Energetics, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions. In J. B. Taylor & D. J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 4: Computer-Assisted Drug Design* (Vol. 4, pp. 193-214). Elsevier.
- Qadri, Kausar, Shweta Kamble, Subha Ganguly, Rajesh Wakchaure, Praveen Kumar Praveen, Saraswat Sahoo, Tanvi Mahajan. 2016. An Overview on Retrovirus. *JBCR*. Research Gate.
- Ragasa, C.Y; Ebajo, V; Reyes, M.D, Mandia, E.H; Brkljača, R dan Urban, S. 2015. Triterpenes from *Calophyllum inophyllum* Linn. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. Vol. 7(4): 718-722.
- Santi, S.R. 2014. Senyawa Antimakan Pada Minyak Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*). *Jurnal Kimia*. Vol. 8(2): 226-230.
- Sharma, Swati, Iti, Garg, Bhuvnesh, Kumar, Mohammad, Zahid, Ashra. 2018.

- Comperative Analysis of Blind Docking Reproducibility. *Life Science Informatics Publications*.
- Warrier, K.C.S. 2010. *Manual of Econormically Important F orestry Species in South India*. Tamil Nadu. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding. Coimbatore. India
- Weiss, R. A. 1996. Retrovirus classification and cell interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37(suppl B), 1–11.
- Win, M.O. 2018. Pharmacological Properties of *Calophyllum inophyllum* – Updated Review. *International Journal of Photochemistry and Photobiology*. Vol. 2(1): 28-32.