

In Silico Study of Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) Flavonoids as Potential HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors

Teuku 'Azzam Sabilil Haq[✉], Btari Kalisha Nyratri, Ira Afridona, Reneta Aisyah Maulina Junus, Shela Salsabila, Bagus Adhinagoro, dan Muchtaridi

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21 Telp. (022) 84288828
Jatinangor 45363

Info Artikel

Diterima: 13-07-2025

Disetujui: 19-08-2025

Dipublikasikan: 30-05-2026

Keywords:

In silico

Flavonoid

HIV-1 RT

Citrus limon

Abstrak

Infeksi Human Immunodeficiency Virus (HIV) masih menjadi permasalahan kesehatan global, dengan enzim HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) sebagai target utama terapi antiretroviral. Flavonoid yang terdapat pada jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) diketahui memiliki beragam potensi farmakologis sehingga berpotensi dikembangkan sebagai kandidat obat antiretroviral baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi senyawa flavonoid dari lemon sebagai inhibitor HIV-1 RT melalui pendekatan *in silico*, yang mencakup penyaringan berdasarkan Lipinski's Rule of Five, prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas (ADMET), pemodelan farmakofor, serta simulasi penambatan molekuler pada reseptor HIV-1 RT (PDB ID: 3LAN). Hasil analisis menunjukkan bahwa tujuh dari sepuluh senyawa memenuhi kriteria Lipinski, dengan quercetin memiliki afinitas ikat paling kuat dengan energi pengikatan -8,84 kkal/mol dan konstanta inhibisi (K_i) sebesar 328,88 nM, diikuti oleh eriodictyol (-7,98 kkal/mol; K_i = 1,41 μ M) dan limositrin (-7,86 kkal/mol; K_i = 1,73 μ M). Seluruh senyawa juga mampu berinteraksi dengan residu asam amino penting pada sisi aktif enzim. Berdasarkan temuan ini, flavonoid lemon berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai inhibitor HIV-1 RT.

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection remains a global health challenge, with HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) serving as the primary target of antiretroviral therapy. Flavonoids present in lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) are known to possess diverse pharmacological properties, offering potential for development as novel antiretroviral agents. This study aimed to evaluate the potential of lemon-derived flavonoids as HIV-1 RT inhibitors through an *in silico* approach, including screening based on Lipinski's Rule of Five, prediction of pharmacokinetic and toxicity profiles (ADMET), pharmacophore modeling, and molecular docking simulations against the HIV-1 RT receptor (PDB ID: 3LAN). The results demonstrated that seven out of ten compounds met Lipinski's criteria, with quercetin exhibiting the strongest binding affinity (-8.84 kcal/mol) and inhibition constant (K_i) of 328.88 nM, followed by eriodictyol (-7.98 kcal/mol; K_i = 1.41 μ M) and limositrin (-7.86 kcal/mol; K_i = 1.73 μ M). All compounds also interacted with key amino acid residues at the enzyme's active site. These findings suggest that lemon flavonoids, particularly quercetin, eriodictyol, and limositrin, hold promise for further development as HIV-1 RT inhibitors.

Pendahuluan

Human Immunodeficiency Virus (HIV) adalah virus sitopatik yang secara taksonomi termasuk dalam famili *Retroviridae*, subfamili *Lentiviridae*, dan genus *Lentivirus*. HIV terbagi menjadi dua tipe utama, yaitu HIV-1 dan HIV-2, yang masing-masing memiliki beberapa subtipe. Di antara keduanya, HIV-1 dikenal lebih virulen dan bertanggung jawab atas sebagian besar kasus infeksi di seluruh dunia (Alum *et al.*, 2024). Sejak pertama kali diidentifikasi pada tahun 1983, HIV telah menyebabkan sekitar 40,4 juta kematian hingga tahun 2022, menjadikannya salah satu tantangan kesehatan global terbesar. Meski demikian, kemajuan penelitian, inovasi terapi antiretroviral (ART), serta peningkatan penanganan infeksi oportunistik telah berhasil mengubah HIV menjadi penyakit kronis yang dapat dikelola, sehingga memungkinkan orang yang hidup dengan HIV menjalani kehidupan yang lebih panjang dan berkualitas, dengan fokus utama pada pencegahan komplikasi kronis (Justiz & Gulick, 2024).

Pengobatan infeksi HIV umumnya dilakukan melalui pemberian terapi antiretroviral (ARV) yang kini tersedia dalam lebih dari 40 jenis obat dari berbagai golongan. ARV bekerja melalui berbagai mekanisme untuk menekan replikasi virus, salah satunya dengan menghambat aktivitas enzim reverse transcriptase yang berperan penting dalam proses replikasi virus HIV (Saag *et al.*, 2018). Upaya pencarian kandidat ARV baru juga terus dilakukan, termasuk dari sumber bahan alam yang memiliki potensi efek farmakologis.

Flavonoid merupakan kelompok senyawa polifenolik yang banyak terdapat pada tumbuhan dan telah menarik perhatian sebagai kandidat inhibitor HIV-1 reverse transcriptase (RT). Hal ini tidak terlepas dari aktivitas antivirusnya yang luas serta potensi efek samping yang relatif rendah. Sejumlah penelitian, baik *in vitro* maupun *in silico*, menunjukkan bahwa flavonoid seperti luteolin, apigenin, quercetin, myricetin, dan turunannya mampu menghambat aktivitas HIV-1 RT melalui berbagai mekanisme, mulai dari inhibisi langsung terhadap enzim hingga perubahan struktur konformasi enzimatis. Temuan serupa juga diperoleh pada studi ekstrak tumbuhan, misalnya *Punica granatum* dan *Moquiniastrum floribundum*, yang berhasil mengidentifikasi flavonoid dengan potensi inhibisi tinggi terhadap HIV-1 RT, ditunjukkan melalui nilai IC_{50} yang kompetitif dibandingkan inhibitor sintetik (Sanna *et al.*, 2021). Menariknya, beberapa flavonoid glikosida seperti herbacitrin dan myricetin-3-rhamnoside memperlihatkan aktivitas ganda, tidak hanya menghambat reverse transcriptase, tetapi juga integrase HIV-1 (Ortega *et al.*, 2017).

Tanaman jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) telah banyak dimanfaatkan karena kandungan metabolit sekundernya yang beragam untuk keperluan pengobatan. Berdasarkan struktur buahnya, lemon terdiri atas tiga bagian utama, yaitu albedo sebagai sumber utama serat (pektin dan selulosa), flavedo yang kaya akan minyak esensial dan pigmen, serta pulp yang mengandung air dan senyawa bermanfaat seperti asam sitrat, asam askorbat, mineral, dan flavonoid. Flavonoid utama yang terdapat pada albedo adalah hesperidin (59% dari total flavanon) dan eriocitrin (35,6%). Selain itu, flavanon lain seperti naringin, neoeriocitrin, neohesperidin, narirutin, eriodictyol, dan naringenin juga telah diidentifikasi. Lemon juga mengandung flavones seperti diosmetin, diosmin, luteolin, vicenin, chrysoeriol, apigenin, sinensetin, serta flavonoid lain seperti quercetin, limocitrin, limocitrol, rutin, dan kaempferol. Senyawa-senyawa tersebut penting untuk diteliti lebih lanjut potensinya sebagai antiretroviral (Liu & Ho, 2022).

Sebagaimana retrovirus lainnya, HIV memiliki enzim reverse transcriptase (RT) HIV-1 yang merupakan enzim esensial dalam siklus hidup virus, karena berperan dalam mengonversi RNA virus menjadi DNA yang kemudian diintegrasikan ke dalam genom inang. Mekanisme ini menjadikan RT sebagai target sentral dalam pengembangan terapi antiretroviral (ART) untuk infeksi HIV/AIDS. Sejak awal diperkenalkannya ART pada tahun 1987, RT telah menjadi sasaran utama dengan hadirnya dua kelas utama inhibitor, yaitu nukleosida (NRTI) dan non-nukleosida (NNRTI). Kedua kelas obat ini terbukti efektif menekan replikasi virus, menurunkan angka mortalitas, serta memperpanjang harapan hidup pasien. Hingga kini, RT tetap menjadi target lebih dari separuh obat ART yang tersedia, menegaskan perannya yang krusial dalam strategi pengendalian HIV/AIDS (Namasivayam *et al.*, 2018). Oleh karena itu, senyawa alami yang mampu menghambat aktivitas HIV-1 RT dianggap berpotensi sebagai kandidat obat antiretroviral (Esposito *et al.*, 2016). Dalam penelitian ini, pengujian difokuskan pada potensi senyawa flavonoid dalam jeruk lemon sebagai inhibitor non-nukleosida reverse transcriptase (NNRTI), yang bekerja dengan cara berikatan langsung pada HIV-1 RT dan menghambat aktivitas RNA serta DNA polimerase secara alosterik (Katzung & Vanderah, 2021).

Metode

Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini berupa komputer desktop dengan sistem operasi Windows 10 Pro 64-bit, prosesor Intel(R) Core(TM) i7-2600 CPU @ 3.40 GHz (8 core), memori RAM sebesar 16 GB, serta kartu grafis NVIDIA GeForce GT 1030. Perangkat lunak dan situs daring yang digunakan meliputi: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) untuk mengunduh struktur protein reseptor; PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) sebagai sumber data struktur senyawa uji dan senyawa pembanding;

ChemDraw Ultra 12.0 dan Chem3D Pro 12.0 untuk menggambar serta meminimalkan energi struktur ligan; DUD.E (<https://dude.docking.org/>) untuk memperoleh data senyawa aktif dan decoy; PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>) untuk memprediksi sifat ADME dan toksisitas; BIOVIA Discovery Studio 2020 untuk preparasi ligan dan reseptor serta visualisasi hasil penambatan; serta AutoDock Tools-1.5.6 untuk analisis docking.

Bahan yang digunakan terdiri atas protein target dalam format PDB dengan kode 3LAN yang diperoleh dari database Protein Data Bank. Selain itu, digunakan senyawa pembanding berupa 3-{{[3-butyl-5-(1-methylethyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl]carbonyl}-5-methylbenzonitrile, serta beberapa senyawa uji yang merupakan flavonoid dan turunannya, yaitu Naringin, Neoeriocitrin, Diosmetin, Apigenin, Vitexin, Isorhamnetin, Orientin, Limositrin, Quercetin, dan Eriodictyol.

Tahap prediksi *Lipinski's Rule of Five* dilakukan dengan mengidentifikasi senyawa aktif pada lemon melalui penelusuran jurnal atau situs phytochem.nal.usda.gov. Selanjutnya, dilakukan pemodelan struktur 2D berdasarkan data dari PubChem atau ChemSpider. Analisis parameter fisikokimia seperti berat molekul, logP, dan jumlah ikatan hidrogen dilakukan secara daring menggunakan SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>). Dari hasil analisis ini, dipilih senyawa yang memenuhi kriteria *Lipinski's Rule of Five*.

Prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas dilakukan melalui laman PreADMET dengan fitur prediksi seperti drug-likeness, ADME, dan toxicity. Struktur senyawa digambar dan disubmit untuk memperoleh hasil prediksi yang selanjutnya dianalisis.

Tahap penapisan farmakofor dilakukan menggunakan aplikasi LigandScout. Database senyawa aktif dan decoy diperoleh dari DUD-E dan diubah ke format .ldb, kemudian dimodelkan menjadi farmakofor berdasarkan struktur aktif yang telah diminimalkan energinya. Dari pemodelan ini diperoleh sepuluh model farmakofor, yang kemudian divalidasi menggunakan kurva ROC (Receiver Operating Characteristic) untuk menentukan model terbaik. Model terpilih selanjutnya digunakan untuk skrining terhadap database senyawa uji sehingga diperoleh kandidat senyawa yang memenuhi kriteria hit.

Persiapan reseptor diawali dengan mengunduh struktur kristal HIV-1 reverse transcriptase (PDB ID: 3LAN) melalui situs RCSB. Ligan standar dipisahkan menggunakan BIOVIA Discovery Studio, kemudian struktur reseptor dipreparasi dengan penambahan atom hidrogen polar dan muatan Kollman menggunakan AutoDock Tools-1.5.6, lalu disimpan dalam format .pdbqt. Preparasi ligan dilakukan dengan menggambar struktur molekul di ChemDraw, mengkonversinya ke bentuk 3D di Chem3D, dan selanjutnya menambahkan atom hidrogen, muatan Gasteiger, serta parameter torsi sebelum disimpan dalam format .pdbqt.

Validasi metode penambatan dilakukan dengan proses *redocking* antara reseptor HIV-1 reverse transcriptase dan ligan aslinya, yaitu N1-butyl pyrimidinedione non-nucleoside inhibitor, untuk memastikan nilai RMSD tidak melebihi 2 Å sebagai indikator keakuratan. Selama proses ini diamati parameter penting seperti residu asam amino yang berinteraksi, ikatan hidrogen, dan nilai RMSD.

Tahap simulasi docking dimulai dengan pembuatan parameter grid berdasarkan hasil pemetaan dari ligan validasi, kemudian disimpan dalam format .gpf. Parameter docking selanjutnya disiapkan menggunakan metode *genetic algorithm* sebanyak 100 kali running dan disimpan dalam format .dpf. Proses docking dilakukan menggunakan AutoDock Tools-1.5.6, sedangkan eksekusi komputasi dijalankan melalui Command Prompt untuk memperoleh hasil akhir penambatan ligan uji terhadap reseptor.

Hasil dan Pembahasan

Prediksi *Lipinski's Rule of Five* (RO5) merupakan konsep penting yang digunakan dalam proses penemuan dan pengembangan obat. Aturan ini membantu memprediksi apakah suatu molekul aktif secara biologis memiliki sifat kimia dan fisik yang mendukung ketersediaan hayati secara oral. Aturan Lipinski mendasarkan penilaian sifat farmakokinetik obat, seperti penyerapan, distribusi, metabolisme, dan ekskresi, pada parameter fisikokimia tertentu. Parameter tersebut meliputi jumlah donor ikatan hidrogen yang sebaiknya kurang dari lima (<5) dan jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari sepuluh (<10). Semakin tinggi jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen, semakin besar energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi. Selain itu, massa molekul senyawa sebaiknya tidak melebihi 500 Dalton, dan nilai Log P (koefisien partisi) idealnya kurang dari lima (<5). Senyawa dengan massa molekul yang terlalu besar atau nilai Log P >5 cenderung kurang larut dalam air dan sulit menembus membran sel (Lohit *et al.*, 2024).

Hasil prediksi dapat dilihat pada **Table 1**. Dari sepuluh senyawa uji yang merupakan komponen metabolit sekunder pada jeruk lemon (*Citrus limon* Linn.), terdapat tujuh senyawa yang memenuhi aturan Lipinski, yaitu diosmetin, apigenin, vitexin, isorhamnetin, limositrin, quercetin, dan eriodictyol. Sementara itu, tiga senyawa lainnya, yaitu naringin, neoeriocitrin, dan orientin, tidak memenuhi kriteria tersebut. Ketujuh senyawa yang memenuhi parameter Lipinski disimpulkan memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai sediaan obat oral sehingga layak untuk dilanjutkan ke tahap pengujian berikutnya.

Tabel 1. Hasil Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

No	Senyawa	Berat Molekul	Log P	Ikatan Hidrogen		Keterangan
				Donor	Akseptor	
1	Apigenin	270.24 g/mol	2.11	3	5	Memenuhi
2	Diosmetin	300.266 g/mol	2.585	3	5	Memenuhi
3	Eriodictyol	288.255 g/mol	1.697	4	6	Memenuhi
4	Isorhamnetin	316.265 g/mol	2.291	4	6	Memenuhi
5	Limositrin	346.291 g/mol	2.300	7	4	Memenuhi
6	Naringin	580.539 g/mol	-2.256	8	14	Tidak Memenuhi
7	Neoeriocitrin	596.538 g/mol	-2.550	9	15	Tidak Memenuhi
8	Orientin	448.380 g/mol	-0.489	8	10	Tidak Memenuhi
9	Quercetin	302.238 g/mol	1.988	5	6	Memenuhi
10	Vitexin	432.381 g/mol	-0.195	7	9	Memenuhi

Prediksi ADME/Tox dilakukan untuk menghindari kegagalan dalam pengembangan dan penemuan obat yang disebabkan oleh hambatan signifikan pada absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan sifat toksisitas suatu kandidat obat. Langkah ini bertujuan mengeliminasi senyawa pada tahap penemuan yang kemungkinan besar akan gagal pada tahap selanjutnya. Karena pengujian ADME secara *in vitro* memerlukan banyak waktu dan sumber daya sehingga kurang efisien, maka dikembangkanlah PreADMET, sebuah aplikasi berbasis web yang dapat memprediksi sifat *drug-likeness* dan data ADME/Tox secara cepat (Nusantoro dan Fadlan, 2020).

PreADMET memiliki fitur prediksi yang mencakup penilaian *drug-likeness*, ADME, dan toksisitas. Fitur *drug-likeness* mengacu pada aturan-aturan yang menghubungkan struktur kimia dengan aktivitas biologis, seperti aturan Lipinski, *lead-like rule*, *CMC-like rule*, *MDDR-like rule*, dan penapisan gugus fungsi reaktif. Fitur ADME sendiri menyediakan berbagai modul prediksi untuk menilai penyerapan usus dari calon obat (Nusantoro dan Fadlan, 2020).

Hasil PreADMET dapat dilihat pada **Tabel 2**. Salah satu parameter penting adalah Human Intestinal Absorption (%HIA) yang menggambarkan persentase dosis oral obat yang diserap melalui saluran usus manusia. Beberapa faktor molekuler memengaruhi %HIA, seperti *Polar Surface Area* (PSA), lipofilisitas, jumlah ikatan hidrogen, dan ukuran molekul. Senyawa dengan PSA rendah cenderung memiliki %HIA lebih tinggi. Meskipun lipofilisitas juga berperan penting, faktor ini bukan satu-satunya penentu %HIA karena jumlah ikatan hidrogen dan ukuran molekul juga memengaruhi kemampuan senyawa menembus membran usus (Komura *et al.*, 2023). Nilai %HIA biasanya diinterpretasikan sebagai tinggi (>70%), sedang (30–70%), atau rendah (<30%). Nilai tinggi menunjukkan penyerapan baik dengan bioavailabilitas tinggi, nilai sedang menandakan penyerapan moderat yang memerlukan optimasi formulasi, sedangkan nilai rendah menunjukkan penyerapan buruk sehingga senyawa perlu dieliminasi atau dimodifikasi (Wang *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil pengujian, apigenin, diosmetin, eriodictyol, isorhamnetin, dan limositrin memiliki %HIA tinggi. Senyawa quercetin dan vitexin berada pada kategori sedang, sedangkan naringin, neoeriocitrin, dan orientin menunjukkan %HIA rendah.

Selain itu, uji permeabilitas Caco-2 dilakukan untuk menilai seberapa mudah suatu senyawa melewati monolayer sel Caco-2 yang menyerupai epitel usus manusia. Metode ini memberikan indikasi awal potensi penyerapan oral dengan mengukur pergerakan senyawa dari sisi apikal ke basolateral. Hasil uji ini dinyatakan dengan koefisien permeabilitas semu (*Papp*) dalam nm/detik. Nilai *Papp* diklasifikasikan menjadi tiga: permeabilitas rendah ($Papp \leq 10$ nm/sec) menunjukkan penyerapan 0–20%, permeabilitas sedang (10–100 nm/sec) menunjukkan penyerapan 20–70%, dan permeabilitas tinggi (>100 nm/sec) menunjukkan penyerapan 70–100% (Kus *et al.*, 2023). Senyawa dengan nilai Caco-2 tinggi diutamakan karena mendukung absorpsi oral yang efektif (Bittermann dan Goss, 2017). Dari hasil uji, apigenin memiliki nilai permeabilitas tinggi, sementara diosmetin, eriodictyol, isorhamnetin, limositrin, naringin, neoeriocitrin, orientin, quercetin, dan vitexin berada pada kategori sedang.

Parameter lain yang penting adalah Plasma Protein Binding (PPB), yaitu persentase senyawa yang terikat pada protein plasma dalam darah. Hanya senyawa dalam bentuk bebas yang aktif secara farmakologis dan mampu menembus jaringan target. Senyawa dengan PPB tinggi memiliki distribusi terbatas karena bagian bebasnya sedikit, tetapi umumnya memiliki waktu paruh yang lebih panjang. PPB tinggi juga meningkatkan risiko interaksi obat karena perubahan ikatan dapat memengaruhi konsentrasi bentuk bebas yang aktif (Talevi dan Bellera, 2021). Nilai PPB dikategorikan menjadi tinggi (>90%), sedang (40–90%), dan rendah (<40%) (Zhang *et al.*, 2019). Senyawa apigenin, diosmetin, eriodictyol, dan quercetin

memiliki PPB tinggi, sedangkan isorhamnetin, limositrin, naringin, neoeriocitrin, orientin, dan vitexin termasuk kategori sedang.

Pengujian Blood-Brain Barrier (BBB) digunakan untuk menilai kemampuan senyawa menembus penghalang darah-otak yang berfungsi melindungi otak dari zat berbahaya. Permeabilitas BBB yang lebih rendah umumnya diinginkan untuk obat yang tidak ditujukan ke sistem saraf pusat (Almutairi *et al.*, 2016). Dalam PreADMET, nilai BBB dikategorikan sebagai penyerapan tinggi ($>2,0$), sedang ($0,1-2,0$), atau rendah ($<0,1$) (Bachtar *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil uji, senyawa dengan nilai BBB rendah adalah isorhamnetin, limositrin, naringin, neoeriocitrin, orientin, dan vitexin. Quercetin memiliki nilai sedang, sedangkan apigenin, diosmetin, dan eriodictyol menunjukkan nilai BBB tinggi.

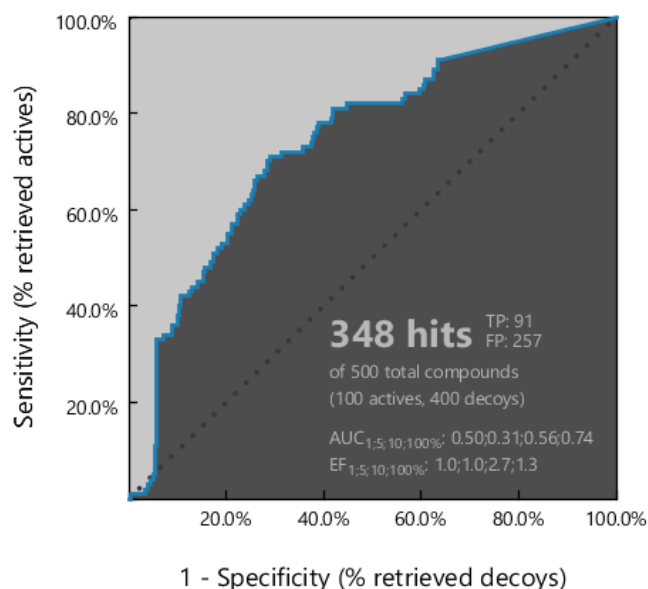
Uji mutagenisitas dan karsinogenisitas penting dilakukan untuk menilai potensi senyawa dalam menyebabkan kerusakan genetik atau memicu kanker. Uji mutagen mendeteksi kemungkinan senyawa memicu mutasi DNA, sedangkan uji karsinogen memeriksa potensi memicu pertumbuhan sel kanker (Nohmi & Watanabe, 2021). Berdasarkan hasil, senyawa yang teridentifikasi non-mutagen adalah naringin, orientin, dan vitexin, sedangkan sisanya memiliki potensi mutagenik. Sementara itu, senyawa yang non-karsinogenik adalah naringin, neoeriocitrin, orientin, dan vitexin.

Tabel 2. Hasil Prediksi ADMET

No	Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksisitas	
		HIA (%)	Caco-2 (nm/sec)	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
1	Apigenin	88.122839	10.5468	97.253409	0.565113	(+)	Mouse : (-) Rat : (+)
2	Diosmetin	88.188263	7.02526	90.160128	0.201086	(+)	Mouse : (+) Rat : (+)
3	Eriodictyol	77.430116	4.5336	100.00000	0.380271	(+)	Mouse : (-) Rat : (+)
4	Isorhamnetin	78.347665	4.93924	83.545382	0.0580929	(+)	Mouse : (-) Rat : (+)
5	Limositrin	76.304002	9.63521	79.618371	0.0532979	(+)	Mouse : (-) Rat : (+)
6	Naringin	11.746560	7.89381	51.060018	0.0303767	(-)	Mouse : (-) Rat : (-)
7	Neoeriocitrin	5.390076	6.40522	51.782485	0.0293005	(+)	Mouse : (-) Rat : (-)
8	Orientin	14.988544	2.99553	63.124774	0.0340797	(-)	Mouse : (-) Rat : (-)
9	Quercetin	63.485215	3.4129	93.236103	0.172765	(+)	Mouse : (-) Rat : (+)
10	Vitexin	31.374153	5.48785	61.323656	0.0385273	(-)	Mouse : (-) Rat : (-)

Permodelan farmakofor menghasilkan sepuluh model farmakofor yang kemudian divalidasi dengan plot kurva ROC (Receiver Operating Characteristic) untuk melihat kemampuan model tersebut dalam membedakan antara senyawa aktif dan senyawa tidak aktif atau decoy. Tahap awal skrining farmakofor dilakukan dengan mengunduh database active dan decoy untuk reseptor *Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase* dengan kode PDB 3lan dari DUD-E yang kemudian diseleksi, sehingga menyisakan 100 senyawa active dan 400 senyawa decoy. Farmakofor didefinisikan sebagai sekumpulan fitur sterik dan elektronik yang penting untuk menjamin interaksi supramolekul yang optimal dengan struktur target biologis spesifik dan untuk memicu atau menghambat respons biologisnya. Permodelan farmakofor mampu menciptakan interaksi antara ligan dan reseptor dengan posisi geometris seperti pola, bidang, dan vektor. Sepuluh model farmakofor yang diperoleh divalidasi dengan plot kurva ROC untuk melihat kemampuan model tersebut dalam membedakan antara senyawa aktif dan decoy (Widyasari *et al.*, 2022). Sumbu Y pada kurva ROC menyatakan true positive rate atau sejumlah senyawa aktif yang diperoleh, sedangkan sumbu X menyatakan false positive rate atau sejumlah senyawa tidak aktif atau decoy yang diperoleh. Kurva ROC yang ideal memiliki nilai pada sumbu Y yang besar. Validasi model farmakofor dilakukan berdasarkan parameter nilai AUC (Area Under Curve) dan EF (Enrichment Factor). Rentang nilai AUC pada kurva ROC adalah $0 \leq \text{AUC} \leq 1$. Suatu model farmakofor dikatakan baik apabila nilai AUC lebih dari 0,50 atau nilai EF lebih dari 1,0 (Seidel *et al.*, 2017). Dari sepuluh model farmakofor

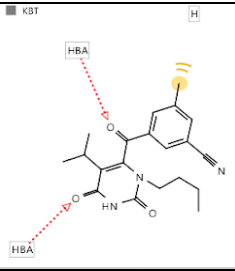
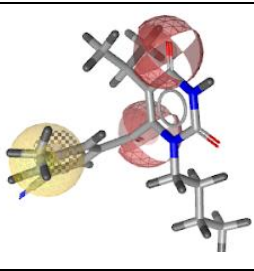
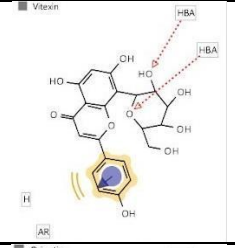
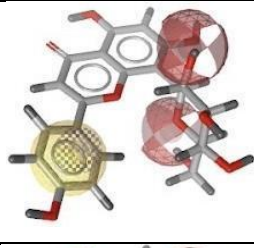
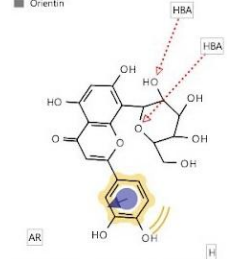
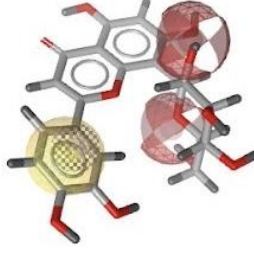
yang diperoleh, model 10 adalah model terbaik dengan nilai AUC 0,74 dan EF 1,3 (**Gambar 1**), sehingga dapat dinyatakan hasil validasi model farmakofor 10 valid.

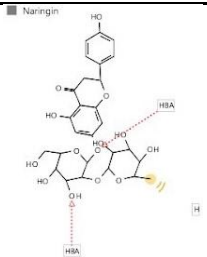
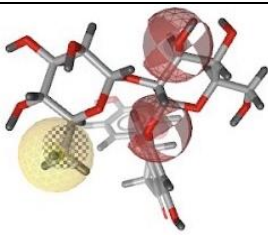
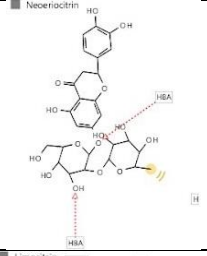
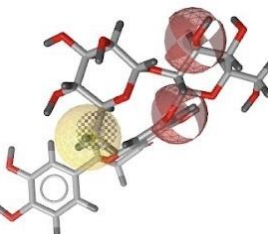
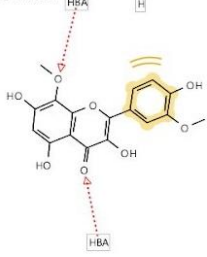
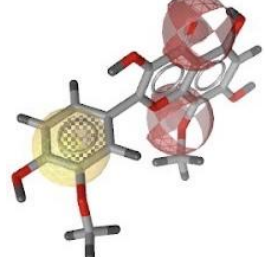
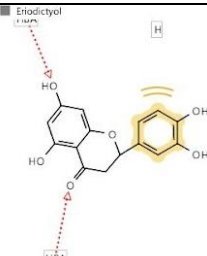
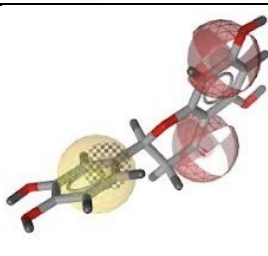
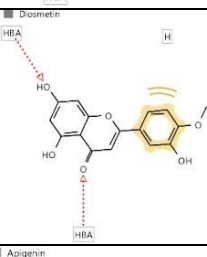
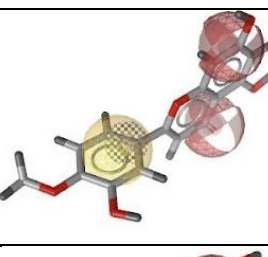
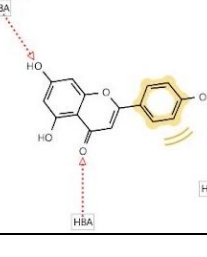
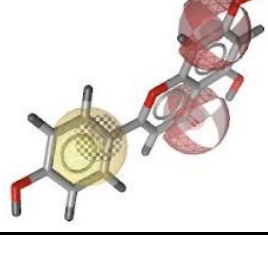


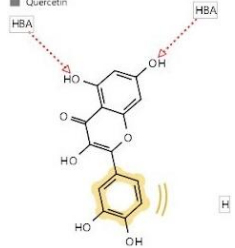
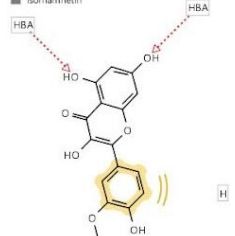
Gambar 1. Kurva ROC Model 10

Model 10 kemudian digunakan untuk melakukan skrining terhadap 10 senyawa uji dan 1 kontrol positif sebagai pembanding. 10 senyawa uji dan kontrol positif tersebut hit terhadap model 10 dengan pharmacophore fit score dan fitur farmakofor (**Tabel 3.**). Pharmacophore fit score menunjukkan tingkat keaktifan suatu fitur farmakofor terhadap reseptor.

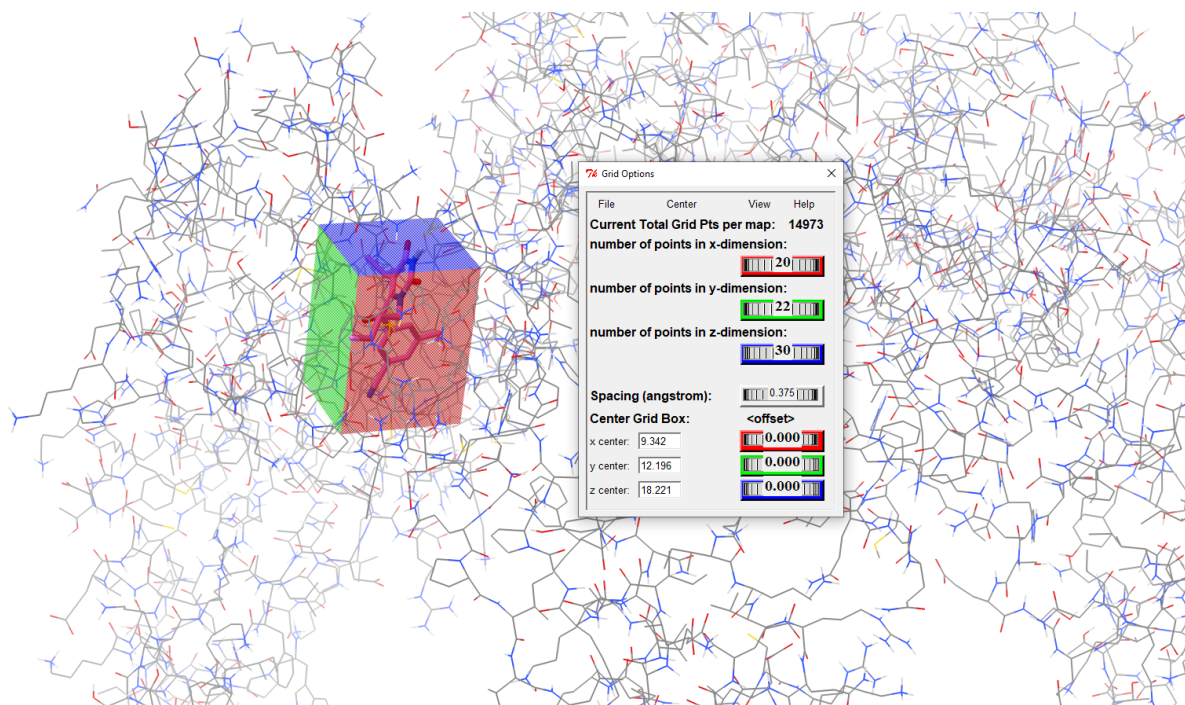
Tabel 3. Hasil Skrining Farmakofor 10 Senyawa Uji dan Kontrol Positif

Senyawa	Model 2D	Model 3D	Pharmacophore Fit Score	Fitur Farmakofor
3- {[3-butyl-5-(1-methylethyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl]carbonyl}-5-methylbenzonitrile (Ligan alami)			36,28	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Vitexin			45,18	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H), gugus aromatik (AR)
Orientin			45,12	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H), gugus aromatik (AR)

Senyawa	Model 2D	Model 3D	Pharmacophore Fit Score	Fitur Farmakofor
Naringin			37,27	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Neoriocitrin			37,27	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Limositrin			36,50	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Eriodictyol			35,88	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Diosmetin			35,69	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Apigenin			35,67	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)

Senyawa	Model 2D	Model 3D	Pharmacophore Fit Score	Fitur Farmakofor
Quercetin			35,44	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)
Isohamnetin			35,40	Akseptor ikatan hidrogen (HBA), daerah hidrofobik (H)

Proses docking dalam penelitian ini divalidasi melalui tahap *re-docking* terhadap ligan standar N1-butyl pyrimidinedione non-nucleoside inhibitor pada reseptor HIV-1 reverse transcriptase (PDB ID: 3LAN). Validasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa metode dan parameter penambatan yang digunakan mampu secara akurat memprediksi posisi serta orientasi ligan di kantong aktif enzim. *Re-docking* dilakukan dengan menetapkan parameter grid yang terpusat pada koordinat $x = 9,342$; $y = 12,196$; $z = 18,221$, dengan ukuran grid masing-masing $x = 20$; $y = 22$; $z = 30$, serta jarak peta grid default sebesar $0,375 \text{ \AA}$ (Gambar 2). Hasil *re-docking* menghasilkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) sebesar $0,51 \text{ \AA}$, yang berada jauh di bawah ambang batas $2 \text{ \AA}$ yang umumnya digunakan sebagai kriteria validasi (Saputra & Susanti, 2018). Nilai *RMSD* yang rendah ini menunjukkan bahwa konfigurasi parameter dan protokol docking yang diterapkan memiliki presisi yang memadai untuk mereproduksi posisi ligan asli, sehingga dapat diandalkan dalam memprediksi afinitas pengikatan serta pola interaksi senyawa uji dengan residu aktif pada HIV-1 reverse transcriptase.



Gambar 2. Grid Box Sisi Aktif Ligan Alami pada Aplikasi AutodockTools-1.5.6

Analisis hasil penambatan molekuler meliputi nilai energi pengikatan, nilai konstanta inhibisi, dan penilaian terhadap interaksi ligan senyawa uji dengan residu asam amino pada reseptor HIV-1 reverse transcriptase (**Tabel 4**).

Tabel 4. Luaran Simulasi Penambatan Molekuler

No.	Senyawa	Cluster	Binding energy (kkal/mol)	Ki (M)	Interaksi dengan asam amino		
					Ikatan hidrogen	Ikatan van der waals	Lain-lain
1	3- {[3-butyl-5-(1-methylethyl)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl]carbonyl} -5-methylbenzonitrile (Ligan alami)	0.0	-10.92	9.97 nM	LYS A:101	-	PRO A:95 LEU A:100 LYS A:103 VAL A:106 TYR A:181 TYR A:188 PHE A:227 TRP A:229 LEU A:234
2	Apigenin	0.0	-7.54	2.96 μ M	LYS A:103 PRO A:236	-	LEU A:100 VAL A:106 TYR A:188 LEU A:234 TYR A:318
3	Diosmetin	0.0	-7.55	2.90 μ M	LYS A:101	-	LEU A:100 LYS A:103 VAL A:106 TYR A:188 LEU A:234 PRO A:236 TYR A:318
4	Eriodictyol	0.0	-7.98	1.41 μ M	PRO A:236	-	VAL A:106 TYR A:188 LEU A:234 TYR A:318
5	Isorhamnetin	0.0	-7.70	2.25 μ M	LYS A:103 PRO A:236	-	LEU A:100 VAL A:106 TYR A:188 LEU A:234 TYR A:318
6	Limositrin	0.0	-7.86	1.73 μ M	LYS A:101 PRO A:236	-	LEU A:100 LYS A:103 VAL A:106 TYR A:188 PHE A:227 LEU A:228 TRP A:229 LEU A:234 TYR A:318
7	Naringin	0.0	+9.98	-	THR A:107	-	PRO A:95 LEU A:100 LYS A:103 VAL A:179 TYR A:188 TRP A:229 HIS A:235 TYR A:318
8	Neeriocitrin	0.0	+2.76	-	LYS A:101 LYS A:103	-	UNN 0 LEU A:100 VAL A:179 TYR A:181

No.	Senyawa	Cluster	Binding energy (kcal/mol)	Ki (M)	Interaksi dengan asam amino		
					Ikatan hidrogen	Ikatan van der waals	Lain-lain
							TYR A:188 PHE A:227 TRP A:229 LEU A:234 HIS A:235 PRO A:236
9	Orientin	0.0	-5.50	93.63 μ M	LYS A:101 LYS A:103	-	VAL A:106 TYR A:188 TRP A:229 LEU A:234
10	Quercetin	0.0	-8.84	328.88 nM	LYS A:101 PRO A:236	-	LEU A:100 LYS A:103 VAL A:106 VAL A:179 TYR A:188 TRP A:229 LEU A:234
11	Vitexin	0.0	-6.30	24.23 μ M	LYS A:101 LYS A:103 VAL A:189	-	VAL A:106 TYR A:188 LEU A:234

Berdasarkan hasil analisis energi pengikatan dan konstanta inhibisi, senyawa flavonoid yang diuji menunjukkan variasi potensi penghambatan berdasarkan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi. Naringin dan Neoeriodictirin tercatat memiliki energi ikatan positif (+9,98 kkal/mol dan +2,76 kkal/mol), nilai positif pada energi ikatan menunjukkan tidak adanya interaksi signifikan karena pengikatan bersifat tidak menguntungkan secara termodinamika (Menchaca *et al.*, 2020). Apigenin, Diosmetin, Isorhamnetin, dan Vitexin termasuk dalam kategori inhibitor dengan efektivitas sedang, ditandai dengan energi ikatan negatif namun dengan stabilitas yang lebih rendah dibandingkan kandidat utama. Orientin merupakan senyawa dengan efektivitas paling rendah, ditunjukkan oleh energi ikatan -5,50 kkal/mol dan nilai Ki yang tinggi (93,63 μ M), yang merefleksikan afinitas yang lemah sesuai dengan prinsip hubungan energi ikatan dan konstanta inhibisi. Di sisi lain, Eriodictyol dan Limositrin memperlihatkan potensi penghambatan yang cukup baik dengan energi ikatan -7,98 kkal/mol dan -7,86 kkal/mol serta nilai Ki dalam kisaran mikromolar rendah (1,41 μ M dan 1,73 μ M), yang menandakan stabilitas interaksi kompleks yang terbentuk. Dari seluruh senyawa yang dianalisis, Quercetin menunjukkan kinerja paling menonjol dengan energi ikatan yang sangat rendah (-8,84 kkal/mol) dan konstanta inhibisi (Ki) yang sangat kecil (328,88 nM), sehingga dapat diidentifikasi sebagai inhibitor paling potensial karena memiliki afinitas pengikatan yang tinggi serta kompleks yang stabil (Josaphat & Fadlan, 2023; Haupt *et al.*, 2015).

Analisis interaksi residu asam amino pada senyawa uji dilakukan dengan membandingkan pola interaksinya terhadap kontrol positif N1-butyl pyrimidinedione (Khan *et al.*, 2019). Secara keseluruhan, pola interaksi penting teridentifikasi pada residu Lys101, Lys103, Val106, Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229, dan Tyr318. Menariknya, residu-residu tersebut konsisten dengan temuan literatur mengenai interaksi ligan pada enzim HIV-1 reverse transcriptase (RT), yang diketahui berperan krusial dalam efektivitas terapi antiretroviral, khususnya kelompok non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Nevirapine (NVP), sebagai NNRTI generasi pertama yang telah disetujui FDA, diketahui mengikat situs allosterik RT sehingga memicu perubahan konformasi yang menghambat aktivitas enzim. Studi kristalografi dan pemodelan molekuler menunjukkan bahwa NVP berinteraksi langsung dengan residu kunci pada Non-Nucleoside Inhibitor Binding Pocket (NNIBP), terutama Lys101, Tyr181, Tyr188, Phe227, dan Trp229, melalui kombinasi interaksi hidrofobik, π - π stacking, serta ikatan hidrogen (Thammaporn *et al.*, 2015). Efavirenz (EFV) juga dilaporkan menunjukkan pola serupa, membentuk ikatan hidrogen dengan tulang punggung Lys101, interaksi π - π stacking dengan Tyr181 dan Tyr188, kontak van der Waals dengan Val106, interaksi dispersif dengan Trp229, serta kontribusi hidrofobik dari Phe227 (Kandathil *et al.*, 2009). Pola-pola ini menegaskan peran residu aromatik dan bermuatan dalam menstabilkan ikatan inhibitor pada pocket enzim HIV-1 RT.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa residu aromatik seperti Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229, dan Tyr318 juga banyak berinteraksi dengan senyawa uji, melalui mekanisme π - π stacking dan hidrofobik yang mendukung pengikatan inhibitor (Wan *et al.*, 2018). Selain itu, Lys101 dan Lys103 muncul hampir pada seluruh kompleks, berperan dalam pengikatan asam nukleat sekaligus memperkuat aktivitas

katalitik enzim melalui pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatis dengan rantai fosfat (Del Río *et al.*, 2023). Beberapa senyawa, termasuk eriodictyol, limositrin, orientin, quercetin, dan vitexin, juga berinteraksi dengan Val106 yang diketahui menjaga stabilitas konformasi serta fleksibilitas RT, sekaligus memengaruhi dimerisasi dan perubahan struktur enzim selama katalisis (Hsieh *et al.*, 2023). Selain itu, Pro236 ditemukan berinteraksi dengan quercetin dan beberapa senyawa lainnya, meskipun tidak terdeteksi pada kontrol positif maupun NNRTI klinis. Residu prolin ini diduga memberikan kontribusi tambahan terhadap fleksibilitas lokal dan stabilitas struktur enzim sehingga fungsi katalitik tetap optimal (Hsieh *et al.*, 2023). Secara keseluruhan, pola interaksi ini menunjukkan bahwa senyawa uji tidak hanya meniru mekanisme pengikatan NNRTI yang sudah mapan (NVP dan EFV), tetapi juga menampilkan interaksi tambahan pada residu tertentu (misalnya Pro236 dan Tyr318) yang berpotensi memperkuat stabilitas kompleks serta meningkatkan potensi penghambatan terhadap HIV-1 RT.

Simpulan

Hasil studi *in silico* menunjukkan bahwa beberapa flavonoid dari jeruk lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) berpotensi sebagai inhibitor HIV-1 reverse transcriptase. Dari sepuluh senyawa yang diuji, tujuh di antaranya yaitu diosmetin, apigenin, vitexin, isorhamnetin, limositrin, quercetin dan eriodictyol memenuhi kriteria *Lipinski's Rule of Five* yang mengindikasikan ketersediaan hayati oral yang baik serta mampu berinteraksi dengan residu penting pada kantong pengikat inhibitor non-nukleosida (NNIBP) seperti Lys101, Lys103, Tyr188 dan Trp229. Analisis kuantitatif menunjukkan bahwa quercetin memiliki afinitas ikat paling kuat dengan energi pengikatan -8,84 kkal/mol dan konstanta inhibisi (K_i) sebesar 328,88 nM, diikuti oleh eriodictyol (-7,98 kkal/mol; $K_i = 1,41 \mu\text{M}$) dan limositrin (-7,86 kkal/mol; $K_i = 1,73 \mu\text{M}$). Temuan ini menegaskan potensi flavonoid lemon khususnya quercetin, eriodictyol dan limositrin sebagai kandidat antiretroviral yang menjanjikan untuk ditindaklanjuti melalui validasi eksperimental baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Daftar Referensi

- Almutairi, M. M., Gong, C., Xu, Y. G., Chang, Y., & Shi, H. 2016. Factors controlling permeability of the blood–brain barrier. *Cellular and molecular life sciences*, 73(1), 57-77.
- Alum, E. U., Uti, D. E., Ugwu, O. P. C., & Alum, B. N. 2024. Toward a cure–Advancing HIV/AIDS treatment modalities beyond antiretroviral therapy: A Review. *Medicine*, 103(27), e38768.
- Bachtiar, K. R., Susanti, S., & Mardianingrum, R. 2021. Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa dalam Minyak Atsiri Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb) Secara *In Silico*. *Journal of Pharmacopolium*, 4(1).
- Bittermann, K., & Goss, K. U. 2017. Predicting apparent passive permeability of Caco-2 and MDCK cell-monolayers: A mechanistic model. *PLoS One*, 12(12), e0190319.
- Del Río, J., López-Carrobles, N., Mendieta-Moreno, J., Herrera-Chacón, Ó., Sánchez-Ibáñez, A., Mendieta, J., & Menéndez-Arias, L. 2023. Charge engineering of the nucleic acid binding cleft of a thermostable HIV-1 reverse transcriptase reveals key interactions and a novel mechanism of RNase H inactivation. *Journal of Molecular Biology*, 435(18), 168219.
- Esposito, F., Carli, I., Del Vecchio, C., Xu, L., Corona, A., Grandi, N., Piano, D., Maccioni, E., Distinto, S., Parolin, C., & Tramontano, E. 2016. Sennoside A, derived from the traditional chinese medicine plant *Rheum L.*, is a new dual HIV-1 inhibitor effective on HIV-1 replication. *Phytomedicine*, 23(12), 1383–1391.
- Haupt, L. J., Kazmi, F., Ogilvie, B. W., Buckley, D. B., Smith, B. D., Leatherman, S., ... & Parkinson, A. (2015). The reliability of estimating K_i values for direct, reversible inhibition of cytochrome P450 enzymes from corresponding IC_{50} values: a retrospective analysis of 343 experiments. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(11), 1744-1750.
- Hsieh, S. H., Yu, F. H., Huang, K. J., & Wang, C. T. 2023. HIV-1 reverse transcriptase stability correlates with Gag cleavage efficiency: reverse transcriptase interaction implications for modulating protease activation. *Journal of Virology*, 97(9), e00948-23.
- Josaphat, F., & Fadlan, A. (2023). Molecular Docking of Acetylacetone-Based Oxindole Against Indoleamine 2, 3-Dioxygenase: Study of Energy Minimization. *Walisongo Journal of Chemistry*, 6(2), 149-157.

- Justiz, A. A., & Gulick, P. G. 2024, July 27. *HIV and AIDS Syndrome*. Nih.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534860/>
- Kandathil, A. J., Joseph, A. P., Kannangai, R., Srinivasan, N., Abraham, O. C., Pulimood, S. A., & Sridharan, G. (2009). HIV reverse transcriptase: structural interpretation of drug resistant genetic variants from India. *Bioinformation*, 4(1), 36–45.
- Katzung, B. G., & Vanderah, T. 2021. *Basic And Clinical Pharmacology*. (15th ed.). Mcgraw-Hill Education.
- Khan, S., Nazir, M., Raiz, N., Saleem, M., Zengin, G., Fazal, G., Saleem, H., Mukhtar, M., Tousif, M. I., Tareen, R. B., Abdallah, H. H., & Mahomoodally, F. M. 2019. Phytochemical profiling, in vitro biological properties and in silico studies on Caragana ambigua stocks (Fabaceae): A comprehensive approach. *Industrial Crops and Products*, 131, 117-124.
- Komura, H., Watanabe, R., & Mizuguchi, K. 2023. The trends and future prospective of in silico models from the viewpoint of ADME evaluation in drug discovery. *Pharmaceutics*, 15(11), 2619.
- Kus, M., Ibragimow, I., & Piotrowska-Kempisty, H. 2023. Caco-2 cell line standardization with pharmaceutical requirements and in vitro model suitability for permeability assays. *Pharmaceutics*, 15(11), 2523.
- Liu, S., Li, S., & Ho, C. T. 2022. Dietary bioactives and essential oils of lemon and lime fruits. *Food Science and Human Wellness*, 11(4), 753-764.
- Lohit, N., Singh, A. K., Kumar, A., Singh, H., Yadav, J. P., Singh, K., & Kumar, P. 2024. Description and in silico ADME studies of US-FDA approved drugs or drugs under clinical trial which violate the Lipinski's rule of 5. *Letters in Drug Design & Discovery*, 21(8), 1334-1358.
- Menchaca, T. M., Juárez-Portilla, C., & Zepeda, R. C. (2020). Past, present, and future of molecular docking. *Drug discovery and development-new advances*.
- Namasivayam, V., Vanangamudi, M., Kramer, V. G., Kurup, S., Zhan, P., Liu, X., ... & Byrareddy, S. N. (2018). The journey of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) from lab to clinic. *Journal of medicinal chemistry*, 62(10), 4851-4883.
- Nohmi, T., & Watanabe, M. 2021. Mutagenicity of carcinogenic heterocyclic amines in Salmonella typhimurium YG strains and transgenic rodents including gpt delta. *Genes and Environment*, 43(1).
- Nusantoro, Y. R., & Fadlan, A. 2020. Analisis sifat mirip obat, prediksi ADMET, dan penambatan molekular isatinil-2-aminobenzoilhidrazon dan kompleks logam transisi Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) terhadap BCL2-XL. *Akta Kimia Indonesia*, 5(2), 114-126.
- Ortega, J. T., Suárez, A. I., Serrano, M. L., Baptista, J., Pujol, F. H., & Rangel, H. R. (2017). The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS research and therapy*, 14(1), 57.
- Saag, M., Benson, C., Gandhi, R., Hoy, J., Landovitz, R., Mugavero, M., Sax, P., Smith, D., Thompson, M., Buchbinder, S., Del Rio, C., Eron, J., Fätkenheuer, G., Günthard, H., Molina, J., Jacobsen, D., & Volberding, P. 2018. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA*, 320, 379–396.
- Sanna, C., Marengo, A., Acquadro, S., Caredda, A., Lai, R., Corona, A., ... & Esposito, F. (2021). In vitro anti-HIV-1 reverse transcriptase and integrase properties of Punica granatum L. leaves, bark, and peel extracts and their main compounds. *Plants*, 10(10), 2124.
- Saputra, D. P. D., & Susanti, N. M. P. 2018. Molecular Docking Sianidin dan Peonidin sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis Secara In Silico. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(1), 28-33.
- Seidel, T., Bryant, S. D., Ibis, G., Poli, G., & Langer, T. 2017. 3D Pharmacophore Modeling Techniques in Computer-Aided Molecular Design Using LigandScout. *Tutorials in chemoinformatics*, 279-309.
- Talevi, A., & Bellera, C. L. 2021. Nonlinear Drug Binding to Plasma Proteins. In *The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics* (pp. 1-7). Cham: Springer International Publishing.

- Thammaporn, R., Yagi-Utsumi, M., Yamaguchi, T., Boonsri, P., Saparpakorn, P., Choowongkamon, K., ... & Hannongbua, S. (2015). NMR characterization of HIV-1 reverse transcriptase binding to various non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with different activities. *Scientific Reports*, 5(1), 15806.
- Wan, Y., Tian, Y., Wang, W., Gu, S., Ju, X., & Liu, G. 2018. In silico studies of diarylpyridine derivatives as novel HIV-1 NNRTIs using docking-based 3D-QSAR, molecular dynamics, and pharmacophore modeling approaches. *RSC advances*, 8(71), 40529-40543.
- Wang, N.-N., Huang, C., Dong, J., Yao, Z.-J., Zhu, M.-F., Deng, Z.-K., Lv, B., Lu, A.-P., Chen, A. F., & Cao, D.-S. 2017. Predicting human intestinal absorption with modified random forest approach: a comprehensive evaluation of molecular representation, unbalanced data, and applicability domain issues. *RSC Advances*, 7(31), 19007–19018.
- Widyasari, A. D., & Dewi, C. 2022. Pemodelan Farmakofor dan Skrining Virtual dari Database Senyawa Bahan Alam sebagai Inhibitor Sars-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polimerase. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*, 1(6), 247-257.
- Zhang, X., Liu, T., Zhang, Y., Liu, F., Li, H., Fang, D., Wang, C., Sun, H., & Xie, S. 2019. Elucidation of the Differences in Cinobufotalin's Pharmacokinetics Between Normal and Diethylnitrosamine-Injured Rats: The Role of P-Glycoprotein. *Frontiers in Pharmacology*, 10.