

## Research Article

# Goniothalamine Effective In Vitro Against Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type-1

(Goniothalamine Is Effective In Vitro Against Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type-1)

Ainulakhir Hussin<sup>1,2</sup>, Norefrina Shafinaz Md Nor<sup>1</sup>, Adibah Ahamad Bahtiar<sup>1</sup>, Bohari Mohd Yamin<sup>1</sup>, dan Nazlina Ibrahim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Science and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Pathology Department, Queen Elizabeth Hospital, 88596 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

\*Corresponding author: nazlina@ukm.edu.my

### ABSTRAK

Permasalahan besar yang dihadapi dalam rawatan jangkitan virus herpes manusia jenis I (Human Herpes virus type 1, HHV-1) adalah kehadiran virus mutan yang rintang ubat antivirus iaitu acyclovir. Pencarian ubatan dengan kebolehan mengatasi HHV-1 rintang-acyclovir diperlukan bagi mengatasi masalah ini. Maka, kajian ini bertujuan menentukan konfigurasi Goniothalamine (GTN) yang dipencilkan daripada *Goniothalamus umbrosus* seterusnya mengenalpasti kebolehannya secara *in vitro* merencat pencilan HHV-1 mutan yang rintang-acyclovir. Kristal yang terhasil selepas pengekstrakan bahagian akar dan batang *G. umbrosus* disahkan melalui GC-MS, FTIR dan NMR sebagai GTN. Kiraan puncak gandingan J (*J coupling peak calculation*) menunjukkan bahawa sebatian aktif ini dalam konfigurasi-cis. Sebelum ujian antivirus dilakukan, nilai kepekatan sitotoksik GTN yang membunuh 50% populasi sel Vero (CC<sub>50</sub>) ditentukan iaitu 8.747 µg/mL. Kepekatan GTN lebih rendah daripada nilai CC<sub>50</sub> digunakan untuk penentuan kesan aktiviti antivirus. Sebanyak sebelas pencilan mutan digunakan bagi menentukan kesan aktiviti antivirus GTN dalam asai pasca-rawatan. Nilai kepekatan berkesan menurunkan 50% pembentukan plak (EC<sub>50</sub>) adalah antara 0.47 µg/mL (2.35 µM) hingga 1.42 µg/mL (6.42 µM). Nilai indeks pemilihan (SI) iaitu nisbah keberkesanan aktiviti antivirus berbanding kesitotoksikan adalah antara 6 hingga 17 yang menunjukkan bahawa GTN mempunyai potensi baik untuk bertindak sebagai agen antivirus. Kesimpulannya, GTN dalam konfigurasi cis berkesan merencat pencilan virus mutan rintang-acyclovir. Potensi tindakan tersebut penting dalam menangani kehadiran virus rintang-acyclovir terutama yang mempunyai mutasi pada timidin kinase atau polimerase DNA.

**Kata kunci:** Aktiviti antivirus, goniothalamine, HHV-1 rintang acyclovir, sebatian terbitan stilipiron

### ABSTRACT

A major problem faced in treatment of virus infection is the presence of (Human Herpes virus type 1, HHV-1) antiviral drug resistant viruses i.e. acyclovir. Thus, search for drugs with the capability to encounter acyclovir-resistant HHV-1 is urgently needed. This study is aimed to configure the goniothalamine (GTN) isolated from *Goniothalamus umbrosus* followed by identifying the *in vitro* ability to inhibit acyclovir-resistant HHV-1 mutants. Crystals developed following extraction from the root and bark of *G. umbrosus* was confirmed by GC-MS, FTIR and NMR as goniothalamine. The J coupling peak calculation confirms that the active compound was in a *cis*-configuration. Prior to the antiviral activity determination, the cytotoxic concentration of GTN that killed 50% of the vero cell population (CC<sub>50</sub>) was determined with a CC<sub>50</sub> value of 8.747 µg/mL. GTN concentration lower than the CC<sub>50</sub> value was used in the determination of antiviral activity. Eleven HHV-1 mutant isolates were tested in the post-treatment assay to determine the antiviral activity. The effective concentration that reduces 50% of viral plaque formation (EC<sub>50</sub>) ranged from 0.47 µg/mL (2.35 µM) to 1.42 µg/mL (6.42 µM). The selective index (SI) ratio that determines the effectiveness of antiviral activity to cytotoxicity is between 6 to 17 which indicates that GTN has good potential to act as an antiviral agent. In conclusion, GTN in *cis* configuration has the ability to inhibit acyclovir-resistant mutant isolates. This potential is important to encounter the current problem in transmission of ACV-resistant mutants especially with thymidine kinase or DNA polymerase mutations.

**Key words:** Acyclovir resistant HHV-1, antiviral activity, goniothalamine, styrylpyrone derivative substance

### Article History

Accepted: 1 December 2022

First version online: 26 December 2022

### Cite This Article:

Hussin, A., Md Nor, N.S., Bahtiar, A.A., Yamin, B.M. & Ibrahim, N. 2022. Goniothalamine berkesan secara *in vitro* terhadap Virus Herpes Manusia Jenis 1 rintang-acyclovir. Malaysian Applied Biology, 51(5): 261-269. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2369>

### Copyright

© 2022 Malaysian Society of Applied Biology

## PENGENALAN

Sebatian terbitan stirilpiron (SPD) iaitu goniothalamine (GTN) adalah kumpulan kecil fenolik semulajadi yang banyak dilaporkan dapat dipencilkan daripada genus *Goniothalamus* (Ahmad et al. 2010; Jusoh et al. 2015). Salah satu spesies yang mengandungi goniothalamine ialah *Goniothalamus umbrosus* J. Sinclair yang juga digelar sebagai kenerak. Goniothalamine yang terbukti mempunyai aktiviti antikanser (Inayat-Hussain et al., 2010; Seyed et al., 2014; Yip et al., 2016), aktiviti antivirus (Abdul-Wahab et al., 2011; Md Nor & Ibrahim, 2012; Abdul Wahab & Ibrahim, 2020; Ibrahim et al., 2022) dan sebagainya. Konfigurasi yang sering dipencilkan secara semulajadi adalah dalam bentuk *trans* (Ahmad et al., 2010). Cubaan mensintesis goniothalamine dalam enantiomer R telah dilakukan (Sundby et al., 2004). Adalah dipercayai bahawa konfigurasi GTN penting dalam menentukan aktiviti biologi sebatian tersebut (Weber et al., 2017).

Acyclovir (ACV) masih merupakan dadah sintetik yang berkesan dalam rawatan terhadap virus herpes manusia jenis 1 (HHV-1) atau dulunya dikenali sebagai virus herpes simplex jenis 1 (HSV-1). Namun, penggunaan ACV yang tidak terkawal menyebabkan kemunculan strain HHV-1 rintang-ACV menyebabkan peningkatan kes jangkitan HHV-1 rintang-ACV yang mendadak dalam tempoh 10-15 tahun selepas penggunaannya (Korovina et al., 2010). Peningkatan kes disebabkan oleh kebolehan HHV-1 untuk berevolusi secara semula jadi apabila terdedah kepada ACV secara berterusan. Pencarian agen antivirus baru yang dapat bertahan apabila dimakan, kurang kesan sampingan dan berkesan terhadap strain virus rintang-ACV amatlah perlu diberi keutamaan dan perhatian.

Kajian ini dilakukan bagi menguji keberkesanan GTN daripada sumber tumbuhan tempatan terhadap mutan HHV-1 rintang ACV. Ini sebagai langkah proaktif dalam pencarian sebatian aktif antivirus yang berkesan terhadap virus mutan ACV. HHV-1 rintang-ACV yang digunakan mempunyai mutasi pada jujukan gen mengekod timidin kinase (TK) dan polimerase DNA (*DNA pol*) (Hussin et al., 2013a; Hussin et al., 2013b).

## BAHAN DAN KAEDAH

### Penyediaan Goniothalamine (GTN)

GTN telah disediakan daripada sampel akar dan batang *G. umbrosus* (baucer spesimen GU01). Ringkasnya, 300 g sampel kering diekstrak dengan petroleum eter menggunakan Soxhlet selama 7 hari. Ekstrak kasar dipekatkan menggunakan rotowap (Heidolph, Germany) dan ditulenkan beberapa kali menggunakan heksana bagi menghasilkan serbuk kristal GTN. Ketulenan sebatian disahkan secara spektroskopik

menggunakan resonans magnet nukleus (NMR), kromatografi gas- spektrum jisim (GC-MS) dan spektroskopi infra-merah transformasi Fourier (FTIR).

### Penyediaan sampel untuk kromatografi gas-spektrometri jisim (GC-MS)

GTN tulen (2 mg) dilarutkan dalam metanol dalam vial dan dianalisis menggunakan kromatografi gas: spektrum jisim (Agilent).

### Penyediaan sampel untuk Transformasi Fourier Spektroskopi Inframerah (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FTIR)

GTN tulen (1 mg) dianalisis menggunakan FTIR GX (Perkin Elmer). Spektrum ditafsirkan melalui perbandingan dengan bacaan spektrum oleh Ahmad et al. (2010).

### Penyediaan sampel untuk Spektroskopi Resonans Magnetik Nukleus (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

GTN tulen (1 mg) dilarutkan dalam 600  $\mu\text{L}$  metanol- $d_4$  dan dipindahkan ke dalam tiub 5.0 mm NMR (Norell™, USA). Spektrum NMR spectrum dihasilkan menggunakan FT-NMR 600MHz cryoprobe (Bruker Corp., USA). Spektrum  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  yang terhasil daripada sampel terdedah pada gelombang magnetik 600MHz direkodkan dan dibandingkan dengan spektrum metanol- $d_4$ . Data dianalisis melalui perbandingan dengan bacaan spektrum oleh Ahmad et al. (2010).

### Stok Sel Vero dan Virus Herpes Manusia Jenis 1 (HHV-1)

Sel ginjal monyet hijau Afrika (Vero) daripada spesies *Cercopithecus aethiops* (American Type Culture Collection, AS) digunakan sebagai sel perumah untuk jangkitan HHV-1. Stok virus HHV-1 pencilan klinikal dan 11 pencilan HHV-1-rintang-ACV (Hussin et al., 2013a; Hussin et al., 2013b) diperolehi daripada stok simpanan Makmal Virologi, Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM).

### Pensubkulturan sel Vero dan ujian kesitotoksikan

Stok GTN tulen dilarutkan menggunakan pelarut DMSO 10% (i/i) dalam medium pertumbuhan Dulbecco Modified Essential Medium (DMEM) dengan 5% (i/i) serum lembu janin (FBS). Kepekatan yang dipilih untuk ujian kesitotoksikan bagi ACV adalah daripada 0.0125  $\mu\text{g/mL}$  hingga 6400  $\mu\text{g/mL}$  manakala bagi GTN ialah daripada 0.469  $\mu\text{g/mL}$  hingga 240  $\mu\text{g/mL}$ .

Sel Vero dihidupkan dalam medium pengkayaan DMEM dengan FBS 10% (i/i) dan dieram pada suhu 37 °C dengan  $\text{CO}_2$  sehingga

sel menjadi ekalapis. Kemudian, medium kultur dibuang dan sel dibilas dengan medium. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  bahan uji daripada setiap kepekatan dimasukkan ke dalam setiap telaga. Sel tanpa bahan uji serta telaga kosong dengan medium sahaja dijadikan sebagai telaga kawalan. Piring kemudiannya dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C dengan CO<sub>2</sub> 5% sebelum diproses. Proses pewarnaan sel dilakukan menggunakan bahan 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) menggunakan kaedah yang disarankan oleh Mossman (1983). Nilai kepekatan ACV atau GTN yang menyebabkan 50% kematian sel (CC<sub>50</sub>) ditentukan. Nilai ketumpatan optik (OD) ditentukan pada panjang gelombang 540 nm menggunakan pembaca piring mikro (Bio-Rad, AS).

Peratus kemandirian sel dikira berdasarkan persamaan seperti berikut:

$$\text{Kemandirian sel (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{ujian}} - \text{OD}_{\text{pengosong}}}{\text{OD}_{\text{sel}} - \text{OD}_{\text{pengosong}}} \times 100$$

OD<sub>ujian</sub> = nilai ketumpatan optik ujian, OD<sub>pengosong</sub> = nilai ketumpatan optik telaga kosong yang diisi dengan DMSO dan OD<sub>sel</sub> = nilai ketumpatan optik sel tanpa rawatan bahan antivirus.

Nilai CC<sub>50</sub> ditentukan melalui analisis regresi tidak linear menggunakan perisian Graphpad Prism 6 versi 6.0.4.

### Penentuan Aktiviti Antivirus GTN

Pengagihan sel dilakukan dengan mengkultur sel Vero dengan kepekatan  $2.0 \times 10^5$  sel/mL dalam piring 12-telaga semalaman atau sehingga sel menjadi ekalapis. Kemudian, medium pertumbuhan dibuang dan diganti dengan 300  $\mu\text{L}$  medium DMEM tanpa FBS yang mengandungi HHV-1 rintang-ACV sebanyak ~80 pfu/telaga. Setelah tempoh penyerapan virus selama 2 jam, sebanyak 1.5 mL medium metilselulosa 1% (b/i) dengan kepekatan GTN tertentu (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hingga 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ditambah. Telaga yang dilitupi medium metilselulosa 1% (b/i) tanpa ACV bertindak sebagai kawalan. Ujian dilakukan sebanyak tiga replikasi. Setelah itu, piring dieram selama 2-3 hari atau sehingga plak yang nyata dicerap penetapan dan pewarnaan sel Vero dilakukan menggunakan pewarna kristal-lembayung. Seterusnya, jumlah plak dikira di bawah mikroskop terbalik dan peratus pengurangan plak dikira menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Peratus pengurangan plak (\%)} = \frac{\text{purata jumlah plak kawalan} - \text{purata jumlah plak ujian}}{\text{purata jumlah plak kawalan}} \times 100\%$$

Nota: Purata jumlah plak kawalan: sel terjangkau tidak dirawat

Purata jumlah plak ujian: sel terjangkau dirawat

Nilai kepekatan berkesan separuh maksimum (EC<sub>50</sub>) GTN bagi setiap pencilan rintang ditentukan melalui analisis regresi tidak linear menggunakan perisian Graphpad Prism 6 versi 6.0.4. Seterusnya, nilai indeks pemilihan (SI) ditentukan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Indeks pemilihan (SI)} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{EC}_{50}}$$


### HASIL DAN PERBINCANGAN

Kajian ini menggunakan kaedah pemencilan GTN daripada akar dan batang *G. umbrosus* yang agak berbeza daripada kajian terdahulu oleh Ahmad *et al.* (2010). Dalam kajian ini, pengestrakan awal menggunakan pelarut petroleum eter selama 7 hari dengan penggunaan peralatan Soxhlet. Dalam kajian Ahmad *et al.* (2010), heksana digunakan diikuti dengan diklorometana, klorofom, etil asetat dan metanol selama tiga hari pada suhu bilik. Analisis melalui GC-MS menunjukkan puncak tertinggi dicerap pada masa penahanan 20.0 dengan berat molekul (*m/z*) GTN adalah 200.1. Jadual 1a menunjukkan perbandingan berat molekul bagi fragmen utama berbanding data yang diperolehi oleh Ahmad *et al.* (2010). Corak fragmen dan kepekatan ion boleh berbeza bergantung kepada peralatan berbeza yang digunakan dan keadaan ujikaji seperti pelarut, voltan dan kaedah pengionan (McMaster & McMaster, 1998). GTN yang terhasil merupakan kristal jernih dengan hujung tajam dan tidak sekata (Jadual 1b).

Kumpulan berfungsi pada struktur GTN telah dikenalpasti melalui spektroskopi FTIR menunjukkan kehadiran proton methine olefinik (C=CH:H3, H4, H5, H6) pada puncak 3405.38  $\text{cm}^{-1}$ . Puncak pada 3028.81  $\text{cm}^{-1}$  (regangan C-H) menunjukkan kehadiran sebatian aromatik. Regangan C-H pada 2918.76  $\text{cm}^{-1}$  pula menunjukkan kehadiran karbon sp<sup>3</sup> metilen proton H1. Ester karbonil C=O dicerap pada 1708.84  $\text{cm}^{-1}$ . Konjugasi regangan karbonil olefein muncul pada frekuensi lebih tinggi yang dicerap pada 1657.1  $\text{cm}^{-1}$  berbanding olefein konjugat aromatik dengan regangan C=C (karbonil konjugat) pada 1577.1  $\text{cm}^{-1}$ .

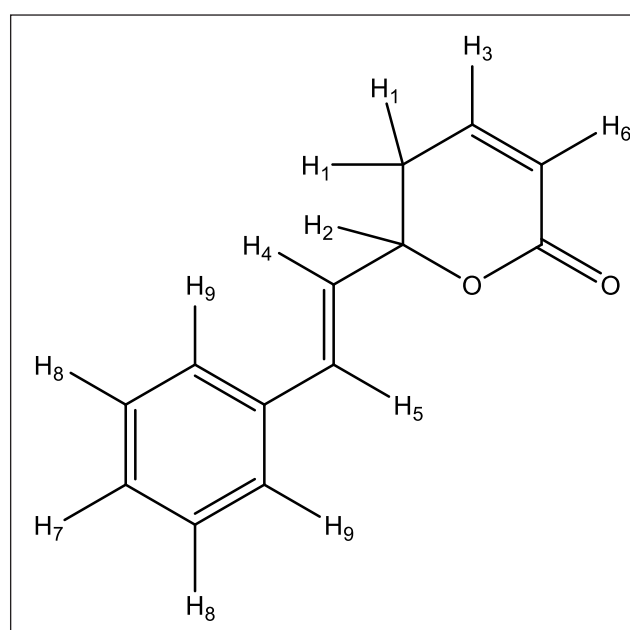
Pengesahan struktur dilakukan melalui NMR dari data spektrum <sup>1</sup>H menunjukkan sebatian mengandungi kumpulan aromatik, C=CH dan CH<sub>2</sub> (Jadual 2). Proton methine (H2) diwakili oleh kuintet pada 5.15-5.18 ppm dengan satu proton yang bergabung dengan C=CH (H4) dan proton metilen (H1). Isyarat pada 29.34 ppm dalam spektrum APT mengesahkan lagi yang H1 adalah CH<sub>2</sub>. Korelasi antara H1, H2 dan H4 dalam spektrum COSY mengesahkan proton methine (H2) berada disamping proton methilen (H1) dan proton methine olefinik (H4) seperti dalam struktur yang dicadangkan (Rajah 1).

**Jadual 1. a)** Berat molekul ( $m/z$ ) bagi fragmen utama GTN daripada *G. umbrosus* daripada kajian ini dan perbandingan dengan hasil diperoleh oleh Ahmad *et al.* (2010) **b)** Gambar kristal GTN dalam heksana

a) Pencilan GTN	Ahmad <i>et al.</i> (2010)	b)
200	200	
171	172	
131	131	
115	115	
103	104	
91	91	
65	68	

**Jadual 2.** Ringkasan puncak NMR (spektrum APT) dengan tetapan jenis karbon

No.	(+) / (-)	Jenis karbon
C1	-	CH <sub>2</sub>
C2	+	O-C-CH
C3	+	C=CH
C4	+	C=CH
C5	+	(aro) C=CH
C6	+	(aro) C=CH
C7	+	(aro) C=CH
C8	+	C=CH
C9	-	C-q
C10	+	C=CH
C11	-	C=O



**Rajah 1.** Struktur goniothalamin berdasarkan data NMR.



Daripada spektrum APT  $^{13}\text{C}$  karbon, dua puncak rendah dinyatakan sebagai C9 dan C11 dikenal pasti sebagai karbon kuarteneri. C11 ditentukan sebagai karbon karbonil (C=O) dengan isyarat dicerap pada 165.19 ppm sementara C9 adalah C-q. Hasil APT ini menepati dan dapat diabsahkan dengan struktur yang dicadangkan. Struktur cadangan diabsahkan lanjut melalui kehadiran puncak proton aromatik dengan 5 proton berhampiran 7.274-7.476 ppm dalam spektrum  $^1\text{H}$  yang disokong oleh isyarat pada 126.38-128.32 ppm dalam spektrum APT. Korelasi HSQC antara H7, H8, H9 dengan C6, C7, C5, masing-masing mengesahkan kehadiran cecincin benzena. Korelasi COSY dengan H7, H8, dan H9 menunjukkan proton-proton tersebut terletak bersebelahan (Rajah 1 dan Jadual 3). Maka, ini mengabsahkan bahawa H7, H8, H9 adalah proton aromatik seperti ditunjukkan dalam struktur cadangan. Puncak H3, H4, H5 muncul dengan kedudukan 'downfield' pada 6.049-6.069 ppm, 6.377-6.414 ppm, 6.768-6.795 ppm masing-masing, yang mencadangkan bahawa proton itu adalah C=CH. Isyarat H6 menganjak ke kedudukan lebih 'downfield' disebabkan kesan anisotropik oleh karbonil. Proton methine olefinik (H3) terhasil oleh dublet dan triplet (dt) dengan 1 daripada proton terletak pada 6.049-6.069 ppm ekoran pergandingan dengan proton methine olefinik (H6) dan proton (H2). Dublet kepada dublet (dd) pada 6.377-6.414 ppm mewakili C=CH (H4) terhasil oleh gandingan dengan proton methine (H2) dan proton methine olefinik (H5). Proton methine olefinik (H5) terhasil oleh dublet pada 6.768-6.795 ppm hasil gandingan dengan proton methine olefinik (H4). Isyarat H5 menganjak ke kedudukan lebih 'downfield' daripada (H4) akibat kehadiran sistem sangat terkonjugat oleh kumpulan fenil.

Ringkasnya, hasil GC-MS, FTIR dan NMR mengesahkan kristal yang dituliskan daripada *G. umbrosus* adalah goniothalamine. Kiraan puncak gandingan J (*J coupling peak calculation*) menunjukkan bahawa sebatian aktif ini dalam konfigurasi-*cis*. Tidak terdapat sebarang puncak lain dalam spektrum NMR yang menunjukkan sebatian tersebut adalah tulen. Ahmad & Din (2002) pernah melaporkan kehadiran dehidrogoniothalamine, goniothalamine dan 5-asetoksi goniothalamine daripada akar *Goniothalamus umbrosus* yang dipencilkan di Sabah. Namun begitu, sebatian yang dipencilkan tersebut adalah dalam konfigurasi-*trans* yang berbeza dengan kajian ini iaitu konfigurasi-*cis*.

Konfigurasi-*cis* bagi GTN amat penting kerana ini mempunyai pengaruh dalam aktiviti biologi GTN (Weber et al., 2017; Martins et al., 2009). Ini diperhatikan juga melalui hasil pendokan in siliko yang dilaporkan oleh Fouzi et al. (2021). GTN sebagai ligan mempunyai kebolehan

untuk berinteraksi dalam konfigurasi ini dengan sekurang-kurangnya empat protein HHV-1 iaitu DNA urasil glikosilase, timidin kinase, glikoprotein B dan DNA polimerase.

Nilai  $\text{CC}_{50}$  bagi bahan antivirus ACV ialah 0.809 mg/mL manakala bagi GTN adalah nilai  $\text{CC}_{50}$  bagi bahan uji GTN ialah 8.747  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nilai  $\text{CC}_{50}$  penting untuk diketahui kerana ianya berperanan sebagai penentu had maksimum bagi kepekatan bahan uji sebelum ujian antivirus dilakukan. Ini bertujuan bagi mengelak ketoksikan kepada sel yang kemudiannya akan menyebabkan hasil ujian antivirus yang tidak tepat. Sehubungan dengan itu, nilai kepekatan yang boleh digunakan untuk tujuan ujian antivirus bagi ACV mestilah tidak melebihi 0.809 mg/mL dan 8.747  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bagi GTN.

Nilai  $\text{CC}_{50}$  bagi bahan uji ACV yang telah diperolehi adalah lebih tinggi berbanding dengan nilai  $\text{CC}_{50}$  bahan uji GTN. Kepekatan yang lebih tinggi diperlukan oleh ACV berbanding GTN untuk membunuh 50% sel Vero. Ini menggambarkan bahawa nilai ketoksikan ACV adalah lebih rendah berbanding GTN. Namun begitu, ini tidak bermaksud GTN tidak berpotensi untuk dibangunkan sebagai bahan antivirus komersil. Ini kerana pengubahsuaian struktur telahpun dijalankan terhadap ACV yang bertujuan untuk mengurangkan tahap ketoksikan sel sebelum dikomersilkan (Elion et al. 1977). Sehubungan dengan itu, sekiranya GTN terbukti mempunyai kesan antivirus terhadap HHV-1 rintang-acylclovir, pengubahsuaian struktur GTN turut boleh dilakukan bagi mengurangkan ketoksikan sel untuk tujuan pengkomersilan.

Sebanyak sebelas pencilan rintang telah berjaya dipencilkan daripada stok pencilan klinikal HHV-1 iaitu UKM-1, UKM-2, UKM-3, UKM-4, UKM-5, UKM-6, UKM-7, UKM-9, UKM-10, UKM-11 dan UKM-12 (Hussin et al., 2013a; Hussin et al., 2013b). Pemencilan dan penulenan HHV-1 rintang-acylclovir dilakukan melalui pendedahan kepada kepekatan ACV melebihi 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Melalui ujian saringan pasca-rawatan, GTN tertulen daripada *G. umbrosus* didapati telah mempamerkan aktiviti antivirus terhadap kesemua pencilan rintang (Jadual 4). Nilai  $\text{EC}_{50}$  yang diperolehi bagi kesemua pencilan adalah di antara 0.5814  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2.907  $\mu\text{M}$ ) dan 1.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (7.2  $\mu\text{M}$ ) (Jadual 4).

Melalui ujian saringan pasca-rawatan, GTN tertulen daripada *G. umbrosus* didapati telah mempamerkan aktiviti antivirus terhadap kesemua pencilan rintang (Rajah 2). Nilai  $\text{EC}_{50}$  yang diperolehi bagi kesemua pencilan adalah di antara 0.5814  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2.907  $\mu\text{M}$ ) dan 1.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (7.2  $\mu\text{M}$ ) (Jadual 5). GTN tertulen yang dipencilkan daripada *G. umbrosus* didapati menunjukkan kesan terhadap pencilan klinikal HHV-1 (Md Nor & Ibrahim 2011; 2012; Abdul-Wahab et al., 2011;

**Jadual 3.** Ringkasan <sup>1</sup>H, HSQC, COSY and HMBC

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Bilangan proton	2	1	1	1	1	1	1	2	2
Jenis proton	CH2	CH	CH	CH	CH	CH	CH-aro	CH-aro	CH-aro
ppm	2.6	5.3	6.1	6.5	6.7	7.2	7.4	7.5	7.6
Gandaan	m	quin/q/m	dt	dd	d	m	t	t	d
HSQC	C1	C2	C3	C4	C8	C10	C6	C7	C5
COSY	H2, H3, H6*	H1, H4	H1, H6	H2, H5	H4	H1*, H3	H8	H7, H9	H8
HMBC	C2, C3, C4, C10, C11	C4, C8, C10	C1, C11	C1, C2, C9	C2, C5, C9	C1, C2, C11	C9, C7	C9, C6, C7, C5	C5, C6, C7, C8

**Jadual 4.** Nilai kepekatan berkesan separuh maksimum (EC<sub>50</sub>) dan nilai indeks pemilihan (SI=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) bagi ACV dan GTN terhadap sebelas pencilan rintang-acylclovir dan pencilan klinikal HHV-1

No.	Pencilan	ACV		GTN	
		EC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI
1.	UKM-1	3.32	243.7	0.96	9.1
2.	UKM-2	>5.63	~143.7	0.96	9.1
3.	UKM-3	>5.63	~143.7	1.05	8.3
4.	UKM-4	2.96	273.3	1.44	6.1
5.	UKM-5	2.25	359.6	1.25	7.0
6.	UKM-6	2.64	306.4	1.29	6.8
7.	UKM-7	2.73	296.3	0.89	9.8
8.	UKM-9	>5.63	~143.7	0.58	15.0
9.	UKM-10	>5.63	~143.7	0.78	11.2
10.	UKM-11	>5.63	~143.7	0.75	11.7
11.	UKM-12	3.66	221.0	0.78	11.2
12.	Pencilan klinikal	<1.13	~715.9	0.43	16

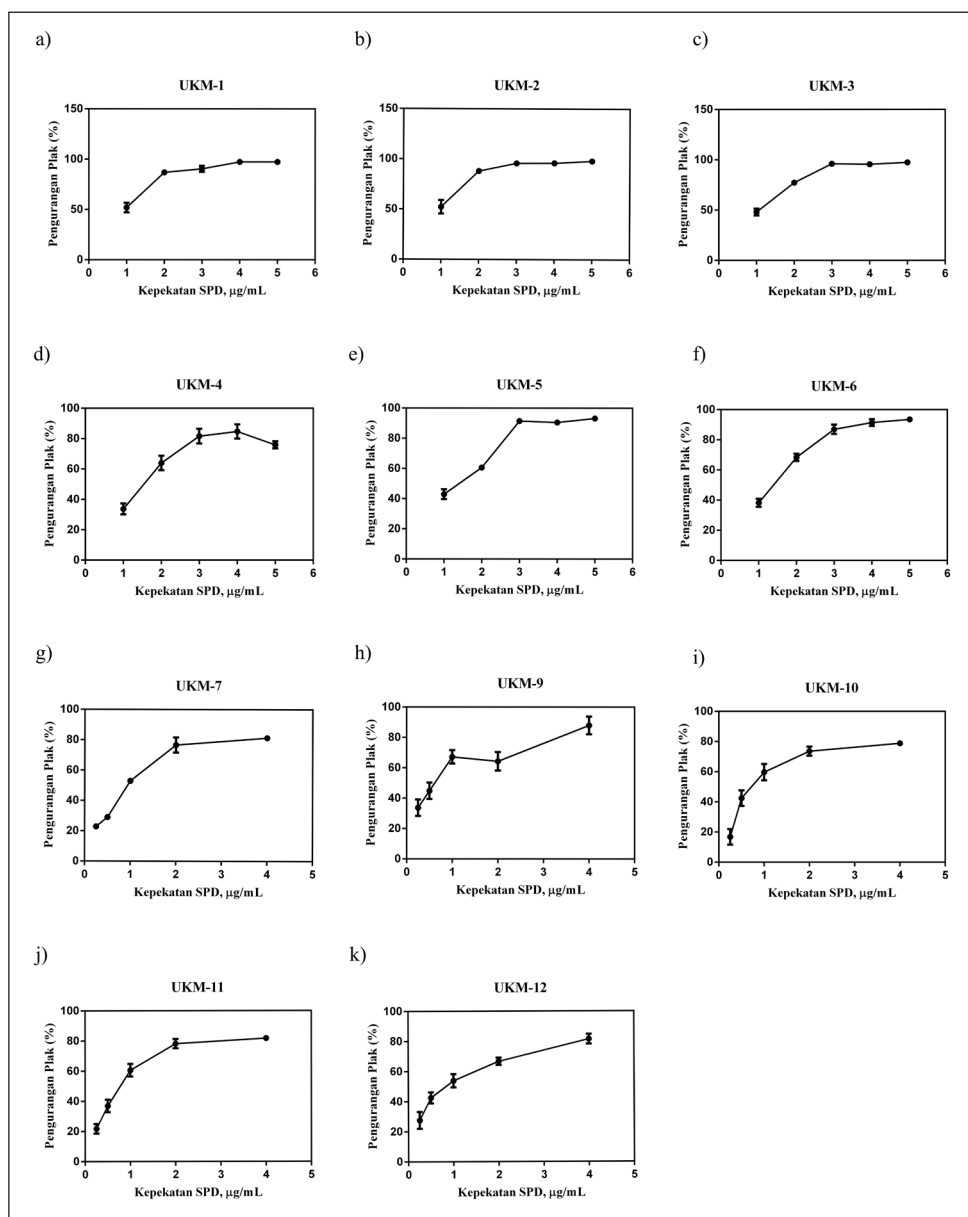
2015) malah terhadap strain KOS-1 (Moses et al., 2014). Ini menunjukkan aktiviti antivirus GTN secara pascarawatan tidak terhad kepada pencilan tertentu HHV-1 sahaja malah julat pencilan yang lebih luas.

Melalui pendekatan pendokan molekul, GTN mempunyai mempunyai keafinan kuat dengan timidine kinase (PDB id: 1OF1) dengan skor pendokan tinggi iaitu -7.9 kkal/mol menghasilkan ikatan hidrogen dan interaksi bukan polar pada residu asid amino sasaran (Fouzi et al., 2021). Ini bermakna, selain daripada tindakan diawal replikasi virus, iaitu 2 jam selepas jangkitan (Md Nor & Ibrahim 2011; Abdul-Wahab et al., 2011; 2015), GTN masih boleh bertindak melalui tindakan timidine kinase jika ianya kekal berada dalam sel terjangkit. Penemuan ini adalah penting kerana kebanyakan mutasi HHV-1 berlaku akibat perubahan jujukan yang melibatkan enzim ini. Perbandingan dalam lokasi pengikatan GTN pada TK dan DNA polimerase daripada kajian Fouzi et al. (2021) dengan jujukan bermutasi pada kesemua pencilan mutan Hussin et al. (2013b) mendapati tiada pertindanan jujukan yang terlibat. Maka, walaupun berlaku mutasi pada TK atau DNA polimerase, GTN masih boleh bertindak

terhadap jangkitan HHV-1 tanpa mengira ianya adalah pencilan liar atau pun mutan. Ubat antivirus dengan mekanisma yang tidak menyasarkan virus secara terus mempunyai peluang rendah untuk mengakibatkan virus bermutasi dan menjadi rintang terhadap dadah (Strasfeld & Chou, 2010). Maka persoalan yang mungkin timbul di masa hadapan adalah apakah kemungkinan untuk terhasilnya virus HHV-1 yang rintang GTN. Dengan tindakan yang ditonjolkan oleh GTN yang mempunyai lebih daripada satu mod tindakan, peluang penghasilan mutan GTN adalah tipis.

Nilai indeks pemilihan (SI) yang diperoleh iaitu di antara 6.07 dan 15.04 (Jadual 1) menunjukkan GTN berpotensi untuk dibangunkan sebagai bahan antivirus alternatif. Menurut Dargan (1998), nilai SI yang melebihi 10 adalah satu petunjuk awal bahawa sesuatu bahan uji itu berpotensi untuk dibangunkan sebagai bahan antivirus komersil. Walaupun nilai SI yang diperoleh ini jauh lebih kecil berbanding bahan antivirus ACV. Namun, tahap ketoksikan GTN terhadap sel boleh dikurangkan melalui pengubahsuaian struktur kimia bagi membolehkan nilai SI yang tinggi iaitu setanding dengan ACV dapat dicapai.

Penghasilan kedua-dua enantiomer



**Rajah 2.** Ujian aktiviti antivirus GTN terhadap sebelas pencilan HHV-1 rintang-acyclovir.

Sel terjangkit HHV-1 rintang-acyclovir dirawat dengan GTN pada lima jenis kepekatan selepas penyerapan virus dan dieram selama 48 jam. Peratus pengurangan plak diperoleh melalui perbezaan plak sel terjangkit yang dirawat dengan GTN dengan sel terjangkit tanpa rawatan (kawalan negatif). (a) pencilan UKM-1; (b) pencilan UKM-2; (c) pencilan UKM-3; (d) pencilan UKM-4; (e) pencilan UKM-5; (f) pencilan UKM-6; (g) pencilan UKM-7; (h) pencilan UKM-9; (i) pencilan UKM-10; (j) pencilan UKM-11; (k) pencilan UKM-12.

goniothalamine pernah dilakukan menggunakan katalisis lipase dengan proses sintesis yang agak panjang (Sundby *et al.*, 2004). Ini boleh dijadikan asas kepada penghasilan komersial sebagai ganti kepada pergantungan kepada pokok sedia ada. Namun, harus diingatkan bahawa kepentingan menjaga pokok *Goniothalamus umbrosus* yang merupakan khazanah ubatan tradisional dengan pelbagai khasiat ini amat penting untuk terus dipelihara.

### KESIMPULAN

GTN dalam konfigurasi *cis* berupaya untuk menindas replikasi HHV-1 rintang ACV tersebut dengan nilai indeks pemilihan dengan julat berbeza antara pencilan mutan. Tindakan antivirus GTN terhadap mutan walaupun lebih rendah daripada virus jenis liar, namun boleh bertindak

terhadap HHV-1 dengan mutasi timidin kinase ataupun DNA polimerase.

### PENGHARGAAN

Kementerian Pengajian Tinggi (FRGS/1/2019/WAB11/UKM/02/1) dan Kementerian Kesihatan Malaysia (NMRR-12-72-12224) di atas penajaan geran penyelidikan serta bantuan pembiayaan pelajaran oleh Yayasan Sultan Iskandar Johor kepada Ainulakhir Hussin.

### KONFLIK KEPENTINGAN

Semua pengarang mengisytiharkan tiada konflik kepentingan.

### REFERENCES

- Abdul-Wahab, N.Z. & Ibrahim, N. 2020. In vitro study, antiviral activity of styrylpyrone derivative against dengue virus type 2. *Asian Journal of Plant Sciences*, 19: 438442. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.438.442>
- Abdul-Wahab, N.Z., Nazlina, I., Sani, H.A. & Pihie, A.L. 2015. The proposed action of styrylpyrone derivative in HSV-1 infected vero cells by differential gene expression. *Research & Reviews in BioSciences*, 10(5): 166-172.
- Abdul-Wahab, N.Z., Shahar, S., Abdullah-Sani, H., Pihie, A.H.L. & Ibrahim, N. 2011. Antioxidant, antibacterial and antiviral properties of *Goniothalamus umbrosus* leaves methanolic extract. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20): 3138-3143. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.758>
- Ahmad, F.B. & Din, L.B. 2002. Isolation and characterization of dehydrogoniothalamine from *Goniothalamus umbrosus*. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 41(7): 1540-1541.
- Ahmad, F.B., Sallehuddin, N.K.N.M. & Assim, Z. 2010. Chemical constituents and antiviral study of *Goniothalamus velutinus*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 6(1): 72-75 <https://doi.org/10.11113/mjfas.v6n1.180>
- Dargan, D.J. 1998. Investigation of the anti-HSV activity of candidate antiviral agents. In: *Herpes Simplex Virus Protocols*. S.M. Brown and A.R. MacLean (Eds.). Humana Press, New Jersey. pp. 387-405. <https://doi.org/10.1385/0-89603-347-3:387>
- Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., De Miranda, P., Beauchamp, L. & Schaeffer, H.J. 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5716-5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>
- Fouzi, S.S., Wahab, N.Z., Yan, L.C. & Ibrahim N. 2021. Styrylpyrone derivative from *Goniothalamus* sp.: A powerful drug for fighting against herpes simplex virus type 1. *Pharmacognosy Journal*, 13(6s):1598-1606. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.206>
- Hussin, A., Md Nor, N.S. & Ibrahim, N. 2013a. Phenotypic and genotypic characterization of induced acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 100(2): 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.008>
- Hussin, A., Nor, N.S.M., Ibrahim, N. 2013b. Amino acid substitutions in the thymidine kinase gene of induced acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *AIP Conference Proceeding*, 1571(1): 254-257. <https://doi.org/10.1063/1.4858664>
- Ibrahim, N. Tai, J.H., Yip, C.W. & Nor, NSM. 2022. Kesan penambahan minyak kelapa dara atau ekstrak aloe vera dalam meningkatkan aktiviti in vitro anti-HHV-1 goniothalamine. *Malaysian Applied Biology*, 51(1): 37-48. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i1.2167>
- Inayat-Hussain, S.H., Chan, K.M., Rajab, N.F., Din, L.B., Chow, S.C., Kizilors, A., Farzaneh, F. & Williams, G.T. 2010. Goniothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. *Toxicology Letters*, 193(1): 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.010>



- Jusoh, S., Ahmad, F., Din, L.B., & Zakaria, Z. 2015. Essential oils from different parts of *Goniothalamus ridleyi* plant. *Sains Malaysiana*, 44(11): 1579-1585. <https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4403-07>
- Korovina, A.N., Gus'kova, A.A., Skoblov, M.Y., Andranova, V.L., Galegov, G.A., Kochetkov, S.N., Kukhanova, M.K. & Skoblov, Y.S. 2010. Mutations in the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus clinical isolates resistant to antiherpetic drugs. *Cell Molecular Biology*, 44(3): 431-438. <https://doi.org/10.1134/S0026893310030118>
- Martins, C.V.B., de Resende, M.A., da Silva, D.L., Magalhaes, T.F.F., Modolo, L.V., Pilli, R.A. & de Fatima, A. 2009. In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1279-1286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04307.x>
- McMaster, M. & McMaster, M. 1998. *GC/MS: A Practical User's Guide*. Wiley-VCH, New York. 167 pp.
- Md Nor, N.S. & Ibrahim, N. 2011. Styrylpyrone derivative of *Goniothalamus umbrosus* inhibit HHV-1 infection during viral early replication cycle. *Antiviral Research*, 90(2): A58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.03.112>
- Md Nor, N. & Ibrahim, N. 2012. Styrylpyrone derivative (SPD) induce cell cycle 415 arrest during herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection. *International Journal of Infectious Disease*, 16(1): e97. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.05.225>
- Moses, M., Md Nor, N.S. & Ibrahim, N. 2014. In vitro virucidal activity of a styrylpyrone derivative against herpes simplex virus strain KOS-1. *AIP Conference Proceedings*, 1614(1): 562-565. <https://doi.org/10.1063/1.4895262>
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *Journal of Immunological Methods*, 65(1): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Seyed, M.A., Jantan, I. & Bukhari, S.N.A. 2014. Emerging anticancer potentials of goniothalamine and its molecular mechanisms. *BioMed Research International*, 2014: ID 536508. <https://doi.org/10.1155/2014/536508>
- Strasfeld, L. & Chou, S. 2010. Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24(2): 413-437. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.01.001>
- Sundby, E., Perk, L., Anthonsen, A., Aasen, A.J. & Hansen, T.V. 2004. Synthesis of (+)-goniothalamine and its enantiomer by combination of lipase catalyzed resolution and alkene metathesis. *Tetrahedron*, 60(3): 521-524. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.102>
- Weber, A., Döhl, K., Sachs, J., Nordschild, A.C.M., Schröder, D., Kulik, A., Fischer, T., Schmitt, L., Teusch, N. & Pietruszka, J. 2017. Synthesis and cytotoxic activities of goniothalamins and derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(22): 6115-6125. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.004>
- Yip, C., Nagaoka, Y., Nor, N.S. & Ibrahim, N. 2016. In vitro evaluation of anticancer effect and neurotoxicity of styrylpyrone derivative (SPD). *AIP Conference Proceedings*, 1784: 020013 <https://doi.org/10.1063/1.4966723>

