

MEKANISME KOMPETITIF BERBAGAI SENYAWA KANDIDAT OBAT SEBAGAI INHIBITOR KOMPLEKS ACE2 DENGAN SPIKE PROTEIN SARS-COV-2

Armi Wulanawati¹, Fachrurrazie², Dewi Nur Wulandari³, Angelyn Bella Elvira⁴

1, 3, 4) Departemen Kimia, FMIPA IPB University, Bogor

2) Politeknik Akademi Kimia Analisis, Bogor

ABSTRAK

SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) menginfeksi manusia melalui ikatan *spike* protein virus dengan dua reseptor pada sel inang, yaitu ACE2 (*Angiotensin Converting enzyme 2*) dan TMPRSS2 (*Transmembrane Serine Protease 2*). Penelitian ini bertujuan menemukan senyawa kandidat obat COVID-19 (*Coronavirus disease*) berdasarkan perubahan energi bebas Gibbs dengan pendekatan simulasi molekuler. Penambatan senyawa kandidat dilakukan terhadap tapak aktif pada *spike* protein virus, yaitu tapak aktif yang berikatan dengan ACE2. Penambatan 115 ligan dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok fitokimia, kelompok minyak atsiri, kelompok penghambat protease, kelompok organisme laut, dan kelompok obat sintesis. Hasil penambatan senyawa kandidat pada tapak aktif dengan ACE2 didapatkan senyawa asparagosida-F dengan nilai ΔG terendah, yaitu -9,8 kkal/mol. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambatan senyawa kandidat akan berjalan spontan. Namun, hasil analisis toksistas Lipinski dan Toxtree menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak dapat diberikan secara oral.

Kata kunci: ACE2, obat, penambatan molekuler, *spike* protein

ABSTRACT

SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) infects humans through binding between viral spike proteins and two receptors on host cells, namely ACE2 (*Angiotensin Converting Enzyme 2*) and TMPRSS2 (*Transmembrane serine protease 2*). This study aims to find candidate compounds for COVID-19 (*Coronavirus disease*) drugs based on changes in Gibbs free energy with a molecular simulation approach. The docking of candidate compounds was carried out on active sites on the viral spike protein an active site that binds to ACE2. The docking was carried out with 115 ligands grouped into five groups, namely the phytochemical group, the essential oil group, the protease inhibitor group, the marine organism group, and the compound group. The docking results of candidate compound at the active site with ACE2 obtained asparagoside-F compound with the lowest ΔG value, ie -9,8 kcal/mol. This shows that the tethering of the compounds will run spontaneously. However, the results of the toxicity analysis carried out on the compounds showed that the compounds

could not be given orally because they did not meet one of the five Lipinski rules.

Keywords: ACE2, drug, molecular docking, spike protein

PENDAHULUAN

SARS-CoV-2 sebagai infeksi sindrom pernapasan akut parah 2 oleh virus corona atau dikenal Coronavirus disease 2019 (COVID-19) merupakan virus yang termasuk dalam genus Betacoronavirus, mengandung genom RNA untai tunggal [(+) ssRNA] positif dan gen yang mengkode proteinase seperti 3C, RNA-dependent RNA polimerase (RdRp), 2'-O-ribosa metiltransferase, spike protein (S), envelope protein (E), nukleokapsid fosfoprotein, dan beberapa protein yang tidak diketahui (Beck et al. 2020). Spike protein (S) SARS-CoV-2 memainkan peran paling penting dalam perlekatan, fusi dan entri virus, serta berfungsi sebagai target untuk pengembangan antibodi, inhibitor entri, dan vaksin (Tai et al. 2020). Spike protein terdiri dari dua sub-unit fungsional, yaitu S1 dan S2. Sub-unit S1 mengandung domain pengikat reseptor (RBD), yang bertanggung jawab untuk mengikat reseptor sel inang, sedangkan Sub-unit S2 berfungsi untuk fusi sel inang dan membran virus. Sub-unit S2 berisi tiga domain fungsional, yaitu peptida fusi (FP), pengulangan heptad (HR) 1, dan HR2 (Our et al. 2020).

Spike protein dapat berada dalam keadaan tertutup yang tidak dapat diakses reseptor atau keadaan terbuka yang dapat diakses reseptor berdasarkan posisi RBD. Pada keadaan tertutup reseptor tidak dapat diakses, semua RBD berada di posisi bawah meliputi subunit S2, sementara dalam keadaan terbuka yang dapat diakses reseptor, setidaknya satu RBD tunggal dalam posisi naik diputar keluar dari S2, sehingga memperlihatkan permukaan pengikatan reseptornya. Struktur konformasional RBD dari bawah ke atas merupakan prasyarat untuk pengikatan reseptor dari spike protein (Our et al. 2020). Hasil penelitian Walls et al. (2020) menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 mengenali angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) manusia sebagai reseptornya. ACE2 dapat ditemukan pada mukosa oral dan nasal, nasofaring, paru, lambung, usus halus, usus besar, kulit, timus, sumsum tulang, limpa, hati, ginjal, otak, sel epitel alveolar paru, sel nterosit usus halus, sel endotel arteri Vena, dan sel otot polos (PDPI 2020).

Protein dengan sifat yang mirip pada virus adalah target utama untuk pengembangan vaksin dan target penting untuk pengembangan obat terapeutik yang berusaha untuk mencegah virus dari menginfeksi sel inang (Robson 2020). Spike protein SARS-CoV-2 memiliki kesamaan 76% urutan asam amino dengan SARS-CoV (Walls et al. 2020). Obat anti-malaria klorokuin (CQ) terbukti menekan infeksi SARS-CoV dalam kultur sel dengan IC50 sekitar 1 M (Maruta dan He 2020). Beberapa analog dari klorokuin berpotensi serta telah diketahui memiliki aktivitas yang sama sebagai anti-malaria (Aguilar et al. 2018). Hidroksiklorokuin merupakan derivat dari klorokuin yang diketahui mampu secara efektif menghambat infeksi SARS-CoV-2 secara in vitro (Liu et al. 2020). Beberapa derivat dari klorokuin menunjukkan potensi sebagai anti-malaria secara in vivo dan in vitro (Yeo et al. 2017). Hasil penelitian Xu et al. (2020) menunjukkan bahwa obat anti-HIV yaitu nelfinavir diketahui memiliki aktivitas antiviral terhadap SARS-CoV-2 pada sel vero E6. Senyawa bahan alam yaitu artemisinin merupakan anti-malaria yang diisolasi dari tumbuhan *Artemisia annua* diduga memiliki aktivitas untuk menghambat aktivitas PAK-1 (protein kinase) yang aktivitas abnormalnya menyebabkan berbagai penyakit seperti malaria dan

infeksi virus pandemi seperti COVID-19 (Maruta dan He 2020). Analog nukleosida merupakan anti-viral berbasis kelompok kecil molekul yang banyak digunakan untuk Flavivirus yang merupakan virus RNA untai tunggal positif (Eyer et al. 2018). Remdesivir merupakan analog nukleosida baru-baru ini dikonfirmasi secara *in vitro* dan telah dibolehkan penggunaannya oleh FDA untuk SARS-CoV-2 (Wang et al. 2020).

Sementara itu, hasil penelitian Yadav et al. (2020) menemukan 18 senyawa fitokimia berpotensi dalam rempah-rempah kunyit (*Curcuma longa*), jintan hitam (*Nigella sativa*), lada hitam (*Piper nigrum*), karom atau ajwain (*Trachyspermum ammi*) dan jahe (*Zingiber officinale*) yang memiliki sifat antivirus. Chikhale et al. (2020) menemukan 14 senyawa fitokimia berpotensi dari *Asparagus racemosus* berdasarkan jenis interaksi ikatan yang terjadi dengan spike protein. Rout et al. (2020) menemukan 17 senyawa fitokimia dari bawang putih (*Allium sativum*) yang memiliki potensi menghambat infeksi COVID-19 berdasarkan energi ikatannya. Balmeh et al. (2020) menemukan 10 senyawa fitokimia dari tanaman herbal timi (*Thymus vulgaris*) yang memiliki potensi menghambat infeksi COVID-19 dari nilai energi bebasnya. Hasil penelitian Umadevi et al. (2020) menemukan 6 senyawa fitokimia dari tanaman siwalan (*Borassus flabellifer*) yang berpotensi menghambat infeksi COVID-19 berdasarkan nilai energi ikatannya. Sebanyak 37 senyawa kandidat dari kelompok minyak atsiri juga merupakan hasil telaah pustaka dari beberapa penelitian sebelumnya. Kumar et al. (2020) menemukan bahwa minyak geranium (*Geranium L.*) dan minyak lemon (*Citrus limon*) menunjukkan efek penghambatan terhadap spike protein dengan reseptor ACE2. Kumar et al. (2020) menemukan 21 senyawa pada minyak atsiri geranium dan 9 senyawa pada minyak atsiri lemon yang memiliki sifat antivirus dan digunakan untuk mencegah interaksi SARS-CoV-2. Hasil penelitian Abdelli et al. (2020) menemukan tujuh senyawa dalam minyak atsiri tanaman *Ammoides verticillate* yang memiliki sifat antivirus dan antimikrob berpotensi menghambat ACE2. Sebanyak 6 senyawa kandidat dari kelompok penghambat protease adalah hasil penelitian Idris et al. (2020), yaitu bromheksin, aprotinin, kamostat, nafamostat, pefabloc sc, dan fenilmetil sulfonil. Kelompok organisme laut terdiri atas 2 senyawa kandidat hasil penelitian Zaporozhets dan Besednova (2020), yaitu asam 4-diktiosfaerat dekalakton A dan ekskavatulida. Kedua senyawa tersebut berasal dari alga hijau (*Dictyosphaeria versluyii*) dan karang halus (*Formosan gorgonian*) yang memiliki sifat antivirus berpotensi menghambat SARS-CoV-2 (Zaporozhets dan Besednova 2020).

Berdasarkan hal di atas, maka penelitian ini menggunakan 115 senyawa yang berpotensi menghambat interaksi SARS-CoV-2 dengan ACE2. Sebanyak 115 senyawa tersebut dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok fitokimia, minyak atsiri, penghambat protease, organisme laut, dan kelompok obat sintetik seperti artemison, heterosiklik sinamik 1, klorokuin-15, indinavir, dan 3-deazanaplanosida A bertindak sebagai senyawa kandidat pembanding untuk hasil penambatan tapak aktif spike protein dengan ACE2.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua jenis, yaitu perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah Lenovo IdeaPad S145 dengan spesifikasi prosesor tipe AMD A9 RAM 4GB. Perangkat lunak yang digunakan meliputi MarvinSketch (ChemAxon), Toxtree-v3.1.0, Python

Molecule Viewer-1.5.6 (Sanner 1999), AutoDock Vina 1.1.2 (Trot dan Olson 2010) AutoDock Tools 1.5.6 (Goodsell dan Olson 1990), dan Discovery visual analyzer (Biovia 2015). Bahan yang digunakan berupa ligan yang didapatkan dari hasil telaah pustaka terhadap 110 senyawa dan 5 senyawa kandidat lain yang berpotensi sebagai obat COVID-19. Ligan dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok fitokimia (65 senyawa), kelompok minyak atsiri (37 senyawa), kelompok penghambat protease (enam senyawa), kelompok organisme laut (dua senyawa), dan kelompok dari penelitian Elvira (2020) (lima senyawa). Protein SARS-CoV-2 yang digunakan adalah protein dalam keadaan terbuka dengan PDB ID 6VYB (Walls et al. 2020). Struktur protein diunduh dari Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RSCB PDB) pada laman <http://www.rscb.org/>.

Prosedur Penelitian

Penyiapan Berkas Ligan dan Protein

Metode penyiapan berkas ligan dan protein mengacu pada Elvira (2020). Struktur 2 dimensi ligan digambar dengan menggunakan perangkat lunak MarvinSketch lalu disimpan dalam format .mol. Struktur 2 dimensi ligan digambarkan bentuk 3 dimensinya dengan menggunakan perangkat lunak MarvinSketch dan disimpan dalam format .mol. Ligan yang telah disimpan dalam format .mol kemudian diubah menjadi format .pdb dengan menggunakan perangkat lunak Marvin Sketch. Ligan yang disimpan dalam format .pdb diproses dengan perangkat lunak Python Molecule Viewer dan AutoDock Tools. Ligan yang telah diproses disimpan dalam format .pdbqt.

Penyiapan Berkas Protein SARS-CoV-2

Metode penyiapan berkas protein SARS-CoV-2 mengacu pada Elvira (2020). Spike protein SARS-CoV-2 yang digunakan adalah spike protein dalam keadaan terbuka dengan PDB ID 6VYB yang ditelusuri dan diunduh pada situs Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RSCB PDB) pada alamat <http://www.rscb.org> dalam format .pdb. Protein 6VYB dalam format .pdb diproses menggunakan perangkat lunak Python Molecule Viewer dan AutoDock Tools. Semua molekul air dihilangkan dan ditambahkan kembali atom hidrogen polar. Protein disimpan dalam format .pdbqt.

Optimasi Grid (Penentuan Tapak Aktif)

Metode optimasi grid penentuan tapak aktif protein mengacu pada Morris et al. (2009). Struktur spike protein yang telah berikatan dengan ACE2 didapatkan dari RSCB PDB dengan PDB ID 6MOJ. Tapak aktif protein dicari dari struktur spike protein tersebut. Setelah tapak aktif protein didapatkan, dilakukan pengaturan grid yang ditentukan berdasarkan bentuk protein dengan nilai sumbu X, Y, dan Z yang sesuai. Posisi grid box diatur sehingga dapat menutupi seluruh bagian sisi aktif protein. Setelah itu hasil dari optimasi tapak aktif disimpan dalam bentuk .gpf.

Penambatan

Metode penambatan mengacu pada Morris et al. (2009). Hasil dari optimasi grid protein disimulasikan dengan proses autogrid. Setelah proses selesai, dilakukan persiapan

parameter penambatan dengan mengatur fleksibilitas makromolekul dan ligannya. Proses output diatur dengan Vina Config (vina.txt). Setelah itu proses penambatan disimulasikan dengan AutoDock Vina. Kemudian akan didapatkan nilai ΔG serta RMSD, dan berkas dari proses penambatan disimpan dalam format ligan_out.pdbqt. Hasil penambatan kemudian dianalisis dengan pilihan analyze AutoDock.

Visualisasi Hasil Penambatan

Visualisasi dan analisis hasil penambatan dilakukan dengan kompleks yang telah disimpan dalam format ligan_out.pdbqt dengan menggunakan perangkat lunak Discovery Visual Analyzer untuk melihat tapak pengikatan dan interaksi ligan dengan protein.

Prediksi aturan Lipinski dan Toksisitas senyawa kandidat

Prediksi aturan Lipinski dilakukan dengan menggunakan situs <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> dan prediksi toksisitas dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Toxtree-v3.1.0 dengan cara mengunggah berkas tiga senyawa kandidat paling berpotensi berdasarkan nilai ΔG yang paling kecil dari ketiga tapak aktif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

SARS-CoV-2 adalah patogen zoonotik yang diketahui dapat berkembang dengan menginfeksi mamalia (Jaimes *et al.* 2020). Menurut Pillaiyar *et al.* (2020) selain dapat menginfeksi hewan, SARS-CoV-2 terus berkembang sehingga dapat menginfeksi manusia dan memberikan efek serius hingga ancaman kematian yang tinggi. SARS-CoV-2 dikelompokkan menjadi 4 kelompok besar berdasarkan struktur genomnya, yaitu alfa, beta, gama, dan delta (Gurung *et al.* 2020).

SARS-CoV-2 memiliki 4 protein struktural, yaitu amplop (E), membran (M), nukleokapsid (N), dan spike (S) yang berperan penting untuk subtipe virus dan memberi respons terhadap reseptor ataupun vaksin (Kim *et al.* 2020). Spike protein SARS-CoV-2 adalah protein penentu utama terjadinya infeksi virus dan bertanggung jawab untuk melakukan pengikatan dengan reseptor dan fusi membran virus (Jaimes *et al.* 2020). Spike protein memiliki tiga bagian, yaitu ectodomain, transmembran, dan ekor pendek intraseluler (Li 2016). Bagian ectodomain mengandung subunit S1 dan subunit S2. Subunit S1 terikat ke reseptor pada permukaan sel, sedangkan subunit S2 yang mengandung peptida melakukan proses fusi membran, sehingga gen virus masuk ke dalam sel inang (Li 2016). Hasil penelitian Walls *et al.* (2020) menemukan bahwa SARS-CoV-2 mengenali ACE2 sebagai reseptornya. RBD subunit S1 berperan berikatan dengan reseptor sel inang ACE2. Spike protein SARS-CoV-2 dapat berada dalam keadaan tertutup yang tidak dapat diakses oleh reseptor atau dalam keadaan terbuka yang dapat diakses oleh reseptor berdasarkan posisi RBD).

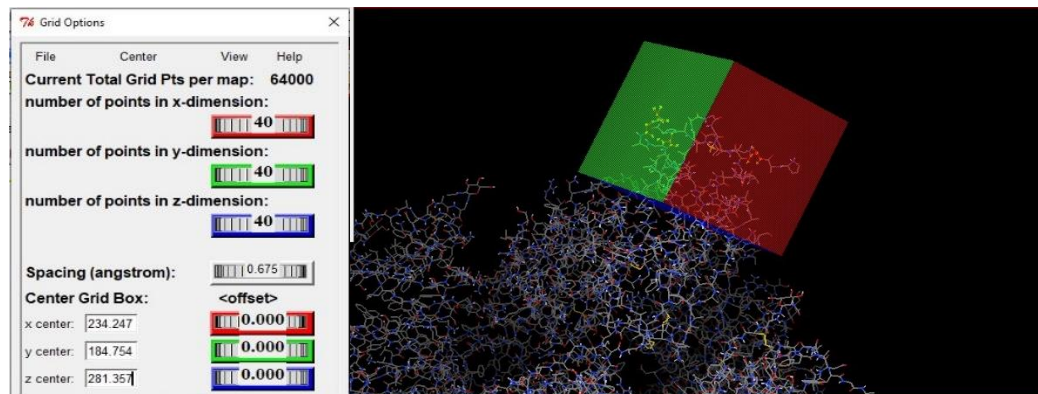
Konformasi terbuka spike protein memperlihatkan RBD pada sub-unit S1. Sub-unit S1 mengandung Receptor Binding Motif (RBM) yang secara langsung berinteraksi dengan ACE2 (Schütz *et al.* 2020). Spike protein bertanggung jawab untuk masuknya virus ke dalam sel inang dengan berikatan pada reseptor ACE2 (Hoffman *et al.* 2020). Pemodelan interaksi antara RBD SARS-CoV-2 dengan ACE2 telah mampu mengidentifikasi beberapa

residu atau asam amino pada spike protein SARS-CoV-2 yang berpotensi terlibat dalam infeksi COVID-19. Pada struktur spike protein SARS-CoV-2 dalam keadaan terbuka yang telah dipublikasikan dengan PDB ID 6VYB dengan resolusi 3.2 Å menggunakan cryo-EM (Walls et al. 2020). Protein 6VYB ini dipilih karena merupakan struktur protein dalam keadaan terbuka sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk desain penghambatan molekuler dan desain vaksin.

Tapak Aktif Protein

Tapak aktif spike protein yang akan ditambah secara *in silico* oleh senyawa kandidat obat, perlu ditentukan sebelum proses penambatan. Senyawa kandidat yang sudah ditentukan akan membentuk ikatan pada tapak aktif spike protein yang sudah ditentukan. Molekul air pada spike protein dihilangkan terlebih dahulu agar tidak mengganggu proses penambatan ligan pada spike protein. Kemudian atom hidrogen polar ditambahkan pada spike protein, sebab atom hidrogen mungkin hilang pada saat kristalisasi sebelum pemodelan molekul protein, sehingga memengaruhi interaksi ligan dengan protein (Zusapa 2013).

Tapak aktif protein biasanya seperti lubang atau cave yang akan diisi oleh ligan (Zusapa 2013). Tapak aktif spike protein didapatkan dari struktur kristal spike protein yang telah berikatan dengan reseptornya, yaitu ACE2 dengan PDB ID 6MOJ (Lan et al. 2020). Asam amino Gln493 pada spike protein diketahui memiliki interaksi dengan Lys31, His34, dan Glu35 pada ACE2. Asam amino Thr500 pada spike protein juga diketahui membentuk ikatan hidrogen dengan Tyr41 pada ACE2. Selain itu, asam amino Gly502 pada spike protein diketahui membentuk ikatan hidrogen dengan Lys353 pada ACE2. Asam amino Tyr505 pada spike protein juga terlihat membentuk ikatan hidrogen dengan Glu37 pada ACE2. Sebanyak 4 residu pada spike protein ini dipilih sebagai tapak aktif spike protein dengan reseptor ACE2. Kemudian dilakukan grid pada tapak aktif yang diketahui telah berikatan langsung dengan reseptor ACE2. Residu yang diketahui sebagai tapak aktif spike protein kemudian ditandai dengan warna merah dan siap untuk dilakukan grid. Grid merupakan sebuah kubus imajiner yang akan mengunci lokasi target proses penambatan dengan dimensi X, Y, dan Z (Zusapa 2013). Terdapat 2 cara dalam menentukan grid; (1) dengan metode oriented docking, yaitu grid box hanya menutupi tapak aktif tertentu pada protein target dan (2) dengan metode blind docking, yaitu grid box menutupi seluruh permukaan protein target. Penelitian ini menggunakan metode oriented docking sehingga hanya tapak aktif yang telah diketahui yang ditutupi. Gambar 1 menunjukkan posisi ketiga tapak aktif pada spike protein. Tapak aktif spike protein yang berikatan dengan reseptor ACE2 memiliki titik pusat grid X, Y, dan Z kemudian diatur berturut-turut 234,247; 184,754; 281,376 dengan nilai 0,675 Å (Gambar 1).



Gambar 1 Penentuan tapak aktif pada *spike* protein SARS-CoV-2 (PDB ID: 6VYB) dengan reseptor ACE2.

Interaksi Protein Ligan

Model mekanisme gembok dan kunci (lock and key) yang diusulkan oleh Emil Fischer digunakan sebagai model mekanisme pengikatan protein. Tapak aktif enzim digambarkan sebagai gembok yang kaku (rigid) dan kokoh, dengan tepat hanya satu substrat kunci (Tripathi dan Bankaitis 2017). Pada tahun 1958, Daniel Koshland mengusulkan model yang diinduksi agar cocok (Induced fit) yang mengasumsikan bahwa tapak pengikatan dalam protein bersifat lentur dan ligan yang berinteraksi menginduksi perubahan konformasi pada tapak pengikatan (Du et al. 2016). Kedua mekanisme ini dilakukan dengan menggunakan pendekatan penambatan molekular. Pada proses penambatan, protein virus diasumsikan sebagai molekul yang kaku, sedangkan ligan diasumsikan sebagai molekul yang memiliki beberapa derajat kebebasan, terutama dalam sudut torsi, karena beberapa parameter lainnya seperti panjang ikatan dan sudut ikatan memiliki nilai konstan untuk konformasi molekul yang berbeda (Mulyati 2016). Oleh karena itu, hasil yang didapat setelah tahap penambatan adalah berbagai energi afinitas interaksi ligan yang dapat terikat pada tapak aktif protein target.

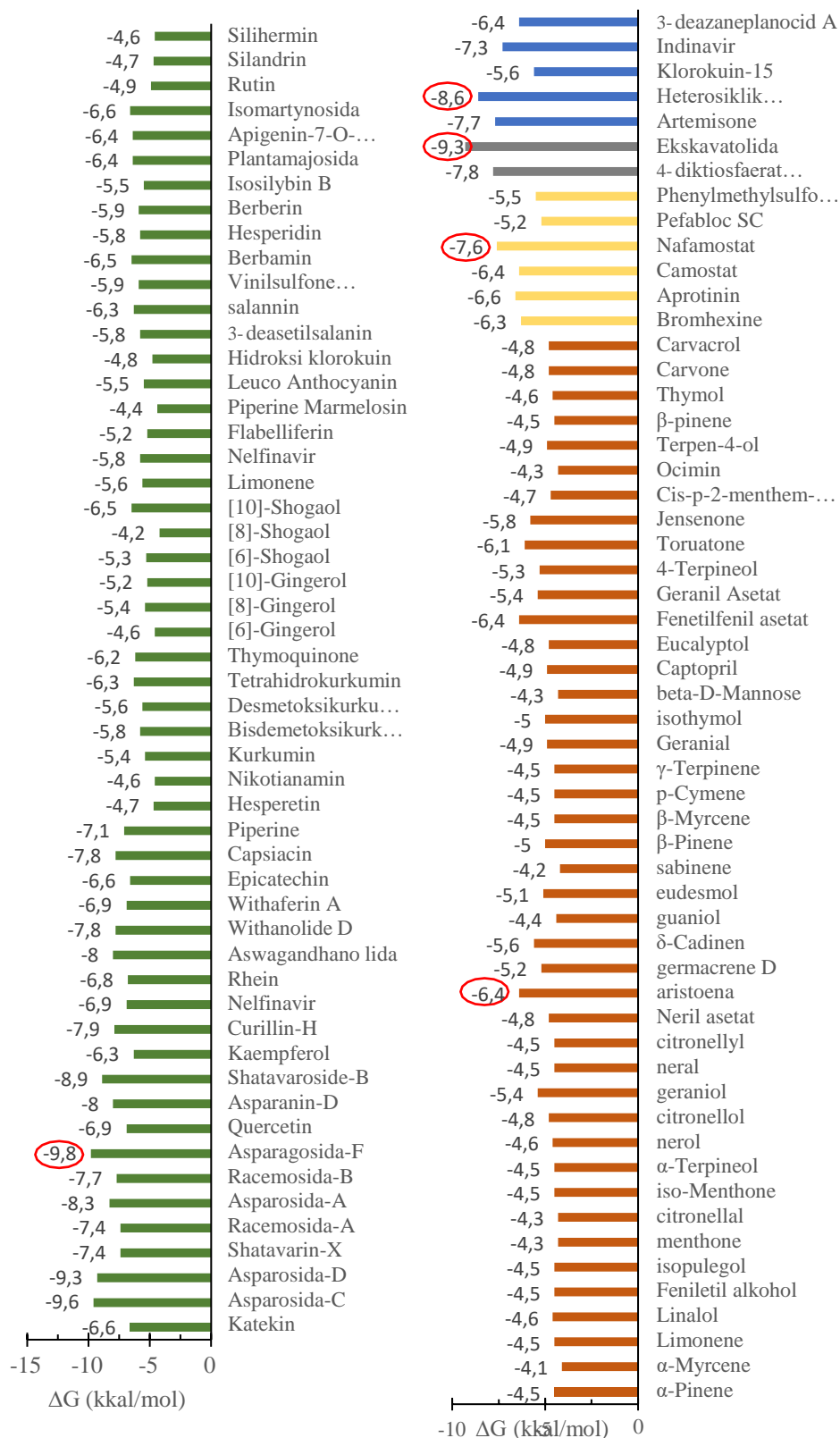
Penambatan pada penelitian ini menggunakan perangkat lunak AutoDock. Prinsip perangkat lunak AutoDock adalah mengevaluasi hasil penambatan dari energi bebas, torsional bebas dari konformasi ikatan yang terbentuk antara protein dan ligan berdasarkan energi medan gaya pada algoritma (Elvira 2020). Nilai energi bebas penambatan yang semakin negatif dan kecil menunjukkan konformasi ligan dan enzim yang semakin stabil (Idrees et al. 2014). Pengikatan protein-ligan hanya terjadi ketika perubahan energi bebas Gibbs (ΔG) dari sistem negatif, ketika sistem mencapai keadaan kesetimbangan pada tekanan dan suhu konstan (Du et al. 2006). Nilai ΔG dapat dianggap menentukan stabilitas kompleks protein-ligan tertentu karena tingkat hubungan protein-ligan ditentukan oleh besarnya ΔG negatif (Du et al. 2016). Oleh karena itu, hasil penambatan molekular yang diinginkan adalah suatu konformasi dengan nilai ΔG yang rendah.

Ligan pada penelitian ini dikelompokkan menjadi lima kelompok besar, yaitu kelompok fitokimia (65 senyawa), kelompok minyak atsiri (37 senyawa), kelompok penghambat protease (enam senyawa), kelompok organisme laut (dua senyawa), dan kelompok obat sintetik (lima senyawa), dengan jumlah total 115 ligan. Sebanyak 115 ligan tersebut ditambahkan terhadap spike protein pada masing-masing ketiga tapak aktif yang sudah ditentukan, yaitu satu tapak aktif antara spike protein dengan ACE2. Masing-masing ligan dari setiap kelompok memiliki 7-9 konformasi dengan nilai ΔG yang berbeda.

Kemudian hanya konformasi dengan nilai ΔG terendah yang dipilih karena memiliki stabilitas yang lebih baik. Ketiga tapak aktif yang telah ditambatkan dengan ligan dari lima kelompok senyawa, kemudian dipilih ligan dengan nilai ΔG terkecil dari masing-masing kelompok senyawa kandidat untuk ketiga tapak aktif.

Gambar 2 menunjukkan hasil penambatan yang dilakukan oleh kelima kelompok pada tapak aktif spike protein dengan reseptor ACE2. Hasil penambatan kelompok fitokimia menunjukkan senyawa asparagoside-F memiliki nilai ΔG terkecil yaitu -9,8 kkal/mol. Hasil penambatan kelompok senyawa minyak atsiri menunjukkan senyawa aristoena memiliki nilai ΔG terkecil, yaitu -6,4 kkal/mol.

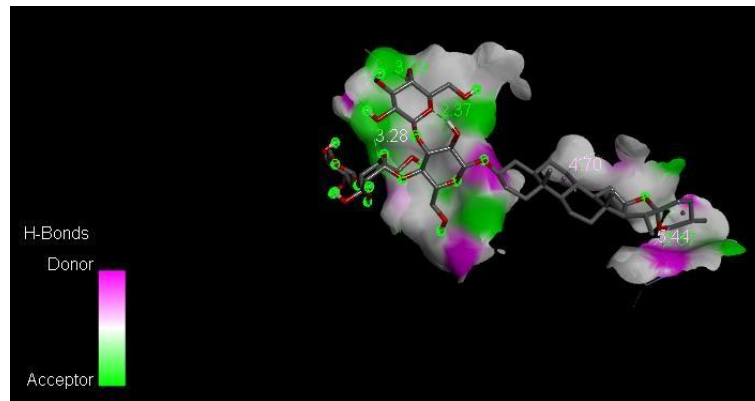
Hasil penambatan kelompok senyawa penghambat protease menunjukkan senyawa nafamostat memiliki nilai ΔG terkecil, yaitu -6,5 kkal/mol. Hasil penambatan kelompok senyawa organisme laut menunjukkan senyawa ekskavatulida memiliki nilai ΔG terkecil, yaitu -7,2 kkal/mol. Hasil penambatan kelompok senyawa lain menunjukkan senyawa heterosiklik sinamik 1 memiliki nilai ΔG terkecil, yaitu -6,5 kkal/mol. Sebanyak 115 senyawa yang ditambatkan terhadap *spike* protein dengan ACE2 memiliki sembilan konformasi dengan nilai ΔG yang berbeda.



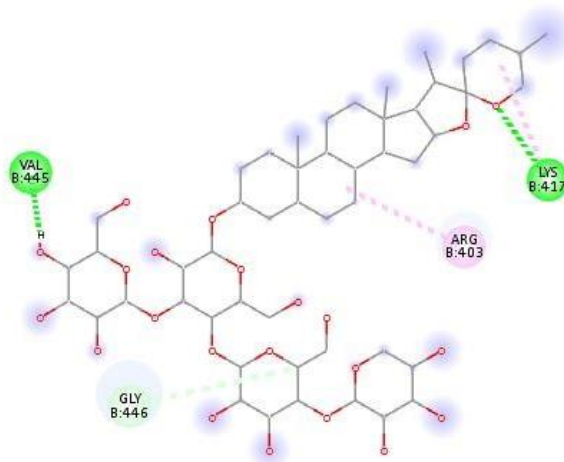
Gambar 2 Grafik nilai ΔG hasil penambatan seluruh ligan dengan tapak aktif spike protein dengan reseptor ACE2 (hijau) fitokimia (oranye) minyak atsiri (kuning) penghambat protease (ungu) organisme laut (biru).

Nilai ΔG terendah dari lima kelompok senyawa pada spike protein dengan ACE2

Hasil penambatan molekular oleh 5 kelompok senyawa kandidat pada spike protein dengan reseptor ACE2 menunjukkan terdapat 5 senyawa kandidat dari setiap kelompok dengan nilai ΔG terendah (Gambar 2). Nilai ΔG asparagosida-F (kelompok fitokimia) paling rendah dari semua kelompok senyawa kandidat, $-9,8$ kkal/mol. Gambar 3 menunjukkan ikatan yang terbentuk antara asparagosida-F dan spike protein. Visualisasi secara 3 dimensi (Gambar 3a) yang diperjelas pada Gambar 7b menunjukkan 2 ikatan hydrogen, yaitu antara residu Val445 dan atom O pada jarak $3,09$ Å serta antara residu Lys417 dan atom O pada jarak $2,37$ Å. Selain itu, terbentuk interaksi karbon-hidrogen pada residu Gly446 berikatan dengan C pada jarak $3,28$ Å, interaksi alkil juga terbentuk pada Arg403 dan Lys417 dengan jarak berturut-turut $4,70$ Å dan $5,44$ Å (Gambar 3b).



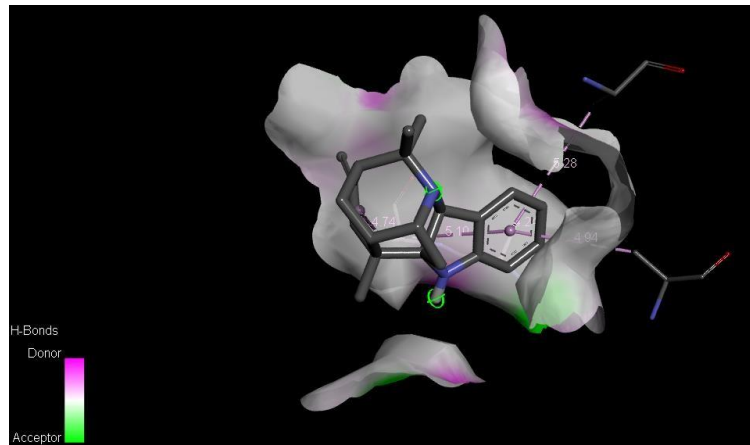
(a)



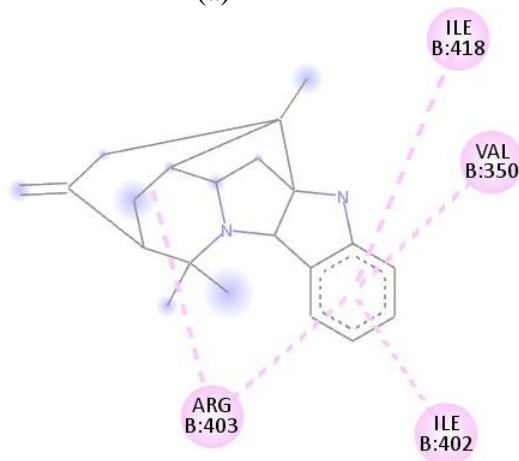
(b)

Gambar 3 Interaksi asparagosida-F dari kelompok fitokimia dengan spike protein dan reseptor ACE2, divisualisasikan secara (a) tiga dimensi, (b) dua dimensi

Aristoena memiliki nilai ΔG -6,4 kkal/mol, paling rendah untuk kelompok senyawa kandidat minyak atsiri yang ditambahkan pada tapak aktif spike protein dengan ACE2. Visualisasi 3 dimensi (Gambar 4) menunjukkan interaksi yang terbentuk beserta jaraknya (Gambar 4a). Interaksi alkil terbentuk pada Ile418 dengan jarak 5,28 Å, Val350 pada jarak 4,94 Å, Arg403 pada jarak 4,74 Å dan 5,10 Å, sedangkan interaksi pi-alkil Ile402 terbentuk dengan jarak 4,24 Å (Gambar 4b).



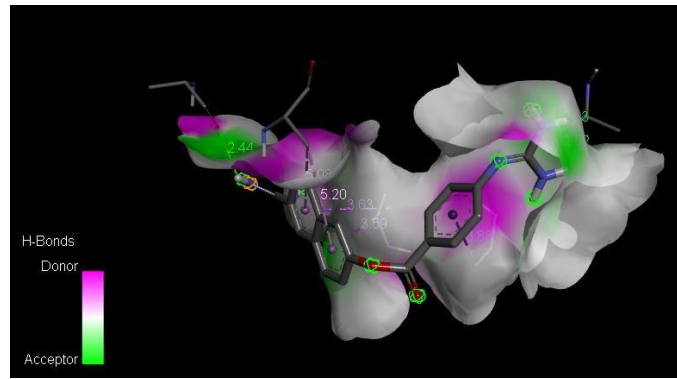
(a)



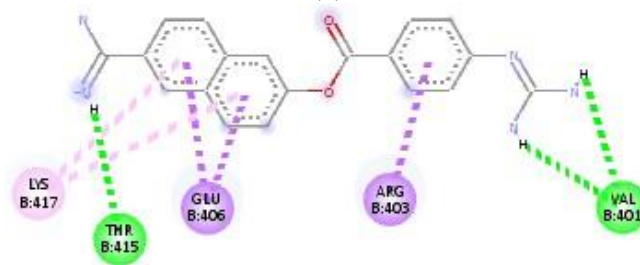
(b)

Gambar 4 Interaksi aristoena dari kelompok minyak atsiri pada spike protein dan reseptor ACE2, divisualisasikan secara (a) tiga dimensi, (b) dua dimensi.

Nafamostat merupakan senyawa kandidat dengan nilai ΔG terendah dari kelompok penghambat protease, yaitu ΔG -6,5 kkal/mol. Ikatan hidrogen terbentuk antara residu Thr415 dan atom H pada jarak 2,44 Å serta antara residu Val401 dan 2 atom H pada jarak berturut-turut 2,62 dan 2,63 Å. Selain itu, terbentuk 3 interaksi pi-sigma pada Glu406 dan Arg403 dengan jarak berturut-turut 3,63; 3,59; dan 3,88 Å, serta 2 interaksi alkil Lys417 dengan jarak 5,08 dan 5,20 Å (Gambar 5b).



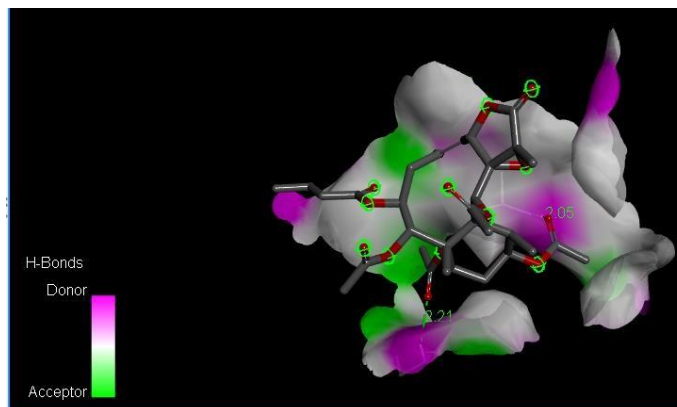
(a)



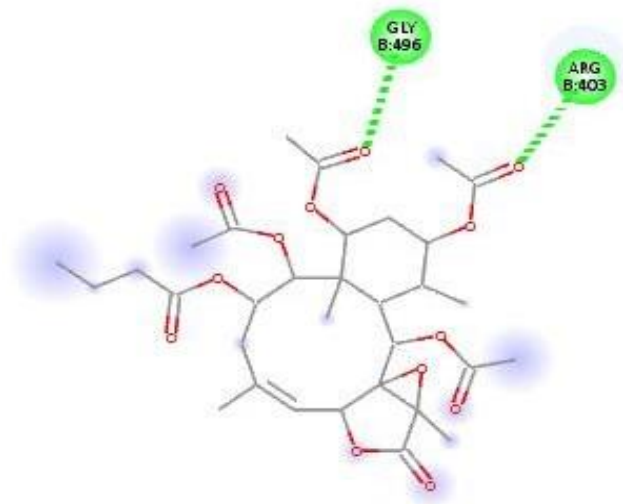
(b)

Gambar 5 Interaksi nafamostat dari kelompok penghambat protease pada spike protein dan reseptor ACE2 (a) tiga dimensi, (b) dua dimensi

Ekskavatulida merupakan senyawa dari kelompok organisme laut yang memiliki nilai ΔG terendah, yaitu $-7,2$ kkal/mol. Visualisasi secara 3 dimensi (Gambar 6a) menunjukkan keberadaan 2 ikatan hidrogen antara residu Gly496 dan atom O (=O) pada jarak $2,21$ Å serta antara Arg403 dengan atom O (=O) pada jarak $2,05$ Å (Gambar 6b).



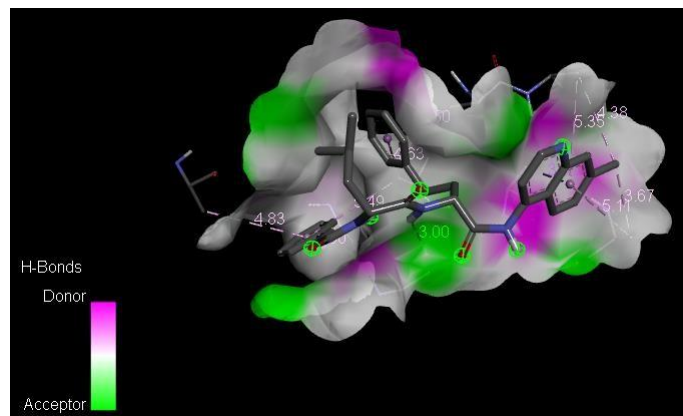
(a)



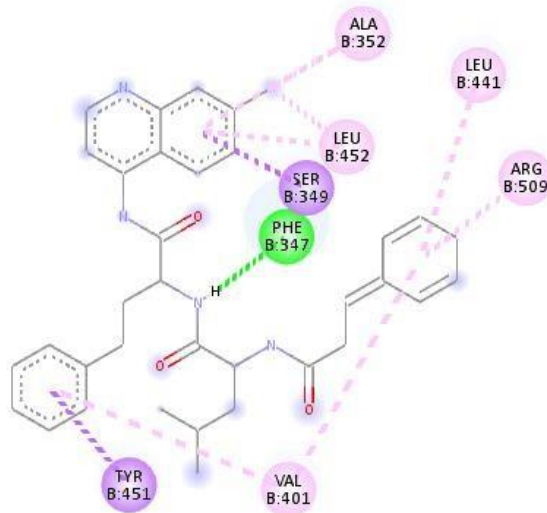
(b)

Gambar 6 Interaksi ekskavatolida dari kelompok organisme laut pada spike protein dan reseptor ACE2 divisualisasikan secara (a) tiga dimensi, (b) dua dimensi.

Heterosiklik sinamik 1 merupakan senyawa kelompok obat sintesis dengan nilai ΔG terendah, yaitu $-6,4$ kkal/mol. Visualisasi hasil penambatan (Gambar 7) menunjukkan interaksi yang terjadi antara heterosiklik sinamik 1 dengan spike protein beserta jarak ikatannya (Gambar 7a). Ikatan hidrogen terbentuk antara residu Phe347 dan atom H pada jarak ikatan $3,00 \text{ \AA}$, interaksi Pi-sigma Ser349 dan Tyr451 terbentuk dengan jarak berturut-turut $3,9 \text{ \AA}$ dan $3,50 \text{ \AA}$, 5 interaksi alkil Ala352, Leu452, Leu441, Arg509, dan Val401 terbentuk dengan jarak berturut-turut $3,67 \text{ \AA}$; $4,38 \text{ \AA}$; $4,83 \text{ \AA}$; $4,90 \text{ \AA}$; $5,49 \text{ \AA}$, 3 interaksi Pi-alkil Ala352, Leu452 dan Val401 terbentuk dengan jarak berturut-turut $5,11 \text{ \AA}$; $5,35 \text{ \AA}$; $4,63 \text{ \AA}$ (Gambar 7b).



(a)



(b)

Gambar 7 Interaksi heterosiklik sinamik 1 dari kelompok obat sintesis pada spike protein dan reseptor ACE2 divisualisasikan secara (a) tiga dimensi (b) dua dimensi

Parameter yang menunjukkan stabilitas kompleks protein-ligan ditentukan oleh besarnya nilai ΔG negatif (Du et al. 2016). Ikatan pembentukan kompleks yang kuat ditandai dengan nilai ΔG yang rendah, tetapan inhibisi rendah, dan banyaknya jumlah interaksi ikatan hidrogen (Tambunan et al. 2010). Suatu enzim akan bekerja secara spontan saat menemukan substrat yang cocok, energi bebas Gibbs-nya akan mengalami penurunan hingga mencapai titik yang rendah (Iqbal 2017). Energi bebas Gibbs menandakan kemampuan ligan untuk membentuk interaksi dengan makromolekul, sehingga semakin negatif nilainya, maka proses yang terjadi semakin spontan, dan ligan semakin mudah berinteraksi pada sisi aktif makromolekul. Jenis interaksi intermolekul yang terjadi pada ligan-reseptor mencakup interaksi elektrostatis, interaksi hidrofobik, dan ikatan hidrogen yang berkontribusi pada penurunan nilai ΔG .

Ikatan hidrogen yang terbentuk antara protein dan ligan dapat menurunkan nilai ΔG (Chen et al. 2014). Ikatan hidrogen melibatkan interaksi atom hidrogen yang terikat secara kovalen dengan atom elektronegatif seperti fluor (F), nitrogen (N), dan oksigen (O) (Glowacka et al. 2011). Ikatan kimia selain ikatan hidrogen yang dapat terjadi akibat ligan yang berinteraksi dengan reseptor adalah interaksi non kovalen atau non ikatan (non-bonded interaction) yang dapat meningkatkan afinitas ligan terhadap reseptor. Stabilitas ligan di situs pengikatan dikaitkan dengan sejumlah besar interaksi pi, seperti pi-sigma, pi-alkil, dan interaksi pi-amida stacked (Elvira 2020). Pembentukan jenis ikatan yang kurang disukai dalam kompleks protein-ligan dapat mengurangi stabilitas kompleks karena jenis ikatan ini menurunkan kekuatan tolakan yang terjadi antara 2 molekul dan atom (Dhorajiwala et al. 2019). Hasil visualisasi penambatan dengan perangkat lunak Discovery Studio dapat berupa jenis ikatan dan interaksi antara ligan-protein, jarak antar ikatan, dan residu protein yang terlibat dalam pengikatan tersebut. Residu asam amino merupakan sebuah asam amino yang berada dalam suatu protein yang pada salah satu ujung rantainya memiliki gugus amino bebas dan pada rantai yang lain memiliki gugus karboksil bebas (Arfi et al. 2020).

Hasil penelitian Elvira (2020) mengajukan lima senyawa kandidat berpotensi yang

mampu menghambat interaksi spike protein dengan reseptor ACE2 berdasarkan urutan nilai ΔG dengan metode penambatan molekuler. Pada penelitian ini lima senyawa kandidat tersebut dijadikan senyawa pembanding karena memiliki nilai ΔG yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa klorokuin. Senyawa klorokuin adalah senyawa yang saat ini digunakan sebagai pengobatan untuk COVID-19. Klorokuin dikenal sebagai obat antimalaria yang diketahui efektif sebagai pengobatan infeksi akut COVID-19 secara in vitro (Bagheri Novir dan Aram 2020). Penambatan senyawa klorokuin pada spike protein dengan reseptor ACE2 yang dilakukan Elvira (2020) menghasilkan nilai ΔG sebesar -4,8 kkal/mol. yang lebih berpotensi dibandingkan senyawa klorokuin berdasarkan nilai ΔG dari hasil penambatan pada spike protein dengan ACE2.

Senyawa kandidat asparagosome-F yang ditambahkan pada tapak aktif spike protein dengan reseptor ACE2 memiliki nilai ΔG -9,8 kkal/mol. Senyawa kandidat shatavarin-X yang ditambahkan pada tapak aktif spike protein dengan bagian satu TMPRSS2 memiliki nilai ΔG -13,3 kkal/mol. Senyawa kandidat shatavarside-B yang ditambahkan pada tapak aktif spike protein dengan bagian dua TMPRSS2 memiliki nilai ΔG -9,1 kkal/mol. Nilai ΔG ketiga senyawa tersebut merupakan nilai ΔG yang paling negatif dari seluruh ligan yang berinteraksi pada ketiga tapak aktif yang sudah ditentukan. Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga senyawa tersebut memiliki kestabilan yang baik saat ditambahkan dengan ketiga tapak aktif pada spike protein. Hal tersebut menunjukkan bahwa ketiga senyawa tersebut merupakan senyawa kandidat yang lebih berpotensi dijadikan sebagai kandidat obat COVID-19 dibandingkan lima senyawa kandidat hasil penelitian Elvira (2020).

Prediksi Aturan Lipinski dan Toksisitas Ligan

Secara umum suatu obat dapat diberikan secara oral jika tidak melanggar lebih dari satu aturan Lipinski. Aturan Lipinski tersebut adalah bobot molekul (BM) maksimum 500 dalton, lipofilitas (Log P) maksimum 5, donor ikatan hidrogen yang dinyatakan dengan jumlah gugus O-H dan N-H maksimum 5, akseptor ikatan hidrogen yang dinyatakan dengan jumlah atom O dan N maksimum 10, dan Refraktifitas Molar (RM) sebaiknya diantara 40 – 130 (Lipinski et al. 2001). Nilai Log P berkaitan dengan lipofilitas atau hidrofobitas yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid atau pelarut non polar (Ruswanto 2014). Obat yang akan digunakan secara oral, harus cukup hidrofobik untuk menembus ke dalam lapisan lipid bilayer dalam membran sel. Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berhubungan dengan aktivitas biologis dari suatu molekul obat (Ruswanto 2014). Nilai Refraksi molar merupakan suatu nilai total polarisabilitas dari molekul obat yang sangat bergantung pada suhu, indeks bias, dan tekanan (Ruswanto 2014).

Nilai bobot molekul berhubungan dengan proses distribusi obat. Proses distribusi obat terjadi dengan menembus membran sel melalui proses difusi. Senyawa dengan bobot molekul lebih dari 500 Dalton mempunyai ukuran yang besar sehingga cukup sulit untuk menembus membran sel, sehingga proses distribusi obat menjadi tidak efisien. Hasil analisis aturan Lipinski (Tabel 1) terhadap 3 senyawa kandidat pada penelitian ini menunjukkan bahwa 3 senyawa tersebut tidak memenuhi satu dari lima aturan Lipinski. Ketiga senyawa kandidat tersebut memiliki bobot molekul yang lebih dari 500 Dalton. Senyawa asparagosome-F memiliki bobot molekul 1035 Dalton, senyawa shatavarin-X memiliki bobot molekul 959 Dalton, dan senyawa shatavarside-B memiliki bobot molekul 1019 Dalton. Data hasil analisis

Lipinski menunjukkan ketiga senyawa tersebut tidak memenuhi aturan Lipinski, sehingga ketiga senyawa tersebut tidak aman diberikan secara oral.

Tabel 1 Hasil analisis aturan Lipinski

Senyawa kandidat	Bobot Molekul (Dalton)	Log P	Ikatan Hidrogen		Refraktifitas Molar
			Donor	Akseptor	
Asparagocide-F	1035	1,53	5	6	77,1457
Shatavarin-X	959	4,95	5	6	77,1457
Shatavaroside- B	1019	4,13	5	6	77,1457

Analisis toksisitas perangkat lunak Toxtree-v3.1.0 dilakukan untuk memprediksi tingkat toksisitas ketiga senyawa kandidat terhadap tubuh manusia (Tabel 2). Uji toksisitas dengan perangkat lunak Toxtree menggunakan parameter Cramer Rule's untuk melihat tingkat toksisitas berdasarkan gugus fungsinya (Ruswanto 2014). Analisis toksisitas dengan perangkat lunak Toxtree memprediksi tingkatan toksistas dari suatu struktur senyawa yang diujikan. Terdapat 3 tingkat prediksi toksisitas dari hasil analisis Toxtree, yaitu Low (Class I) menunjukkan bahwa senyawa uji dengan struktur sederhana dan dapat bekerja efisien pada metabolisme tubuh, Medium (Class II) menunjukkan bahwa senyawa uji dengan struktur yang kurang berbahaya dari senyawa uji golongan Class 1 tetapi tidak memiliki gugus yang berpotensi meningkatkan toksisitas senyawa uji, dan High (Class III) menunjukkan bahwa senyawa uji memiliki gugus fungsi yang berpotensi meningkatkan toksisitas senyawa uji. Hasil analisis toksisitas berdasarkan parameter Cramer Rule's menunjukkan bahwa ketiga senyawa kandidat termasuk ke dalam kalsifikasi toksisitas High (Class III). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ketiga senyawa tidak aman digunakan.

Tabel 2 Hasil analisis toksisitas Toxtree-v3.1.0

Senyawa Kandidat	Hasil Analisis Toxtree
Asparagocide-F	<i>High (Class III)</i>
Shatavarin-X	<i>High (Class III)</i>
Shatavaroside-B	<i>High (Class III)</i>

SIMPULAN

Penambatan 115 senyawa kandidat terhadap *spike* protein SARS-CoV-2 yang dilakukan pada tapak aktif *spike* protein yang berikatan dengan ACE2 diperoleh bahwa senyawa kandidat dari kelompok fitokimia memiliki potensi

sebagai kandidat obat COVID-19 paling tinggi berdasarkan nilai ΔG hasil penambatannya. Senyawa asparagosida-F memiliki nilai ΔG paling rendah dari seluruh senyawa kandidat yang ditambatkan pada tapak aktif *spike* protein dengan ACE2, yaitu -9,8 kkal/mol, sehingga penambatan yang dilakukan senyawa tersebut berlangsung spontan. Namun hasil toksisitas menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki tingkat toksisitas yang cukup tinggi dan tidak dapat diberikan secara oral.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelli I, Hassani F, Bekkel Briki S, Ghalem S. 2020. In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. *J Biomol Struct Dyn.*0(0):1–14. doi:10.1080/07391102.2020.1763199.
- Bagheri Novir S, Aram MR. 2020. Quantum mechanical simulation of Chloroquine drug interaction with C60 fullerene for treatment of COVID-19. *Chem Phys Lett.* 757 June:137869. doi:10.1016/j.cplett.2020.137869.
- Balmeh N, Mahmoudi S, Mohammadi N, Karabedianhajiabadi A. 2020. Predicted therapeutic targets for COVID-19 disease by inhibiting SARS-CoV-2 and its related receptors. *Informatics Med Unlocked.* 20:100407. doi:10.1016/j.imu.2020.100407.
- Beck BR, Shin B, Choi Y, Park S, Kang K. 2020. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. *Comput Struct Biotechnol J.* 18:784–790. doi:10.1016/j.csbj.2020.03.025.
- Chen CL, Lai CT, Lee JY. 2014. Transshipment model-based linear programming formulation for targeting hybrid power systems with power loss considerations. *Energy.* 75:24–30. doi:10.1016/j.energy.2014.05.059.
- Chikhale R V., Sinha SK, Patil RB, Prasad SK, Shakya A, Gurav N, Prasad R, Dhaswadikar SR, Wanjari M, Gurav SS. 2020. In-silico investigation of phytochemicals from *Asparagus racemosus* as plausible antiviral agent in COVID-19. *J Biomol Struct Dyn.*0(0):1–15. doi:10.1080/07391102.2020.1784289.
- Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr HW. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet.* 361(9374):2045–2046. doi:10.1016/S0140-6736(03)13615-X.
- Dhorajiwala TM, Halder ST, Samant L. 2019. Comparative in silico molecular docking analysis of l-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals. *J Appl Biotechnol Reports.* 6(3):101–108. doi:10.29252/JABR.06.03.04.
- Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ. 2016. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *Int J Mol Sci.*17(2):1–34. doi:10.3390/ijms17020144.
- Elvira AB. 2020. Penapisan senyawa kandidat obat berdasarkan afinitas ikatan

- sebagai inhibitor kompleks COVID-19 dengan ACE2 secara *in silico*. [skripsi]. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, *et al.* 2011. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J Virol.* 85(9):4122–4134. doi:10.1128/jvi.02232-10.
- Gurung AB, Ali MA, Lee J, Farah MA, Al-Anazi KM. 2020. Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 Mpro enzyme through in silico approach. *Life Sci.* 255:117831. doi:10.1016/j.lfs.2020.117831.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, *et al.* 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
- Hussain M, Jabeen N, Amanullah A, Ashraf Baig A, Aziz B, Shabbir S, Raza F, Uddin N. 2020. Molecular docking between human TMPRSS2 and SARS-CoV-2 spike protein: conformation and intermolecular interactions. *AIMS Microbiol.* 6(3):350–360. doi:10.3934/microbiol.2020021.
- Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. 2020. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *J Mol Biol.* 432(10):3309–3325. doi:10.1016/j.jmb.2020.04.009.
- Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, *et al.* 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 581(7807):215–220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 23: 3- 25.
- Li F. 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol.* 3 August:237–261. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301. Mahmoud IS, Jarrar YB, Alshaer W, Ismail S. 2020. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. *Biochimie.* 175:93–98. doi:10.1016/j.biochi.2020.05.012.
- Mulyati B. 2016. Studi Komputasi Interaksi Isoflavon Dengan Reseptor Estrogen B Menggunakan Metode Oniom. *EduChemia.* 1(2):137–148.
- Noviardi H, Fachrurrazie F. 2015. Potensi Senyawa Bullatalisin Sebagai Inhibitor Protein Leukotrien a4 Hidrolase Pada Kanker Kolon Secara in Silico.

- FITOFARMAKA J Ilm Farm. 5(2):65–73. doi:10.33751/jf.v5i2.410.
- Phadke M, Saunik S. 2020. COVID-19 treatment by repurposing drugs until the vaccine is in sight. *Drug Dev Res.* 81(5):541–543. doi:10.1002/ddr.21666.
- Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M. 2020. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug Discov Today.* 25(4):668–688. doi:10.1016/j.drudis.2020.01.015.
- Rout J, Swain BC, Tripathy U. 2020. In silico investigation of spice molecules as potent inhibitor of SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn.* 0(0):1–15. doi:10.1080/07391102.2020.1819879.
- Ruswanto. 2014. Desain dan studi interaksi senyawa N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-isonicotinohydrazide pada mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase (INHA). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada.* 12(1):192- 210.
- S. Zaporozhets T, N. Besednova N. 2020. Biologically active compounds from marine organisms in the strategies for combating coronaviruses. *AIMS Microbiol.* 6(4):470–494. doi:10.3934/microbiol.2020028.
- Schütz D, Ruiz-Blanco YB, Münch J, Kirchhoff F, Sanchez-Garcia E, Müller JA. 2020. Peptide and peptide-based inhibitors of SARS-CoV-2 entry. *Adv Drug Deliv Rev.* 167:47–65. doi:10.1016/j.addr.2020.11.007.
- Senthil Kumar KJ, Vani MG, Wang CS, Chen CC, Chen YC, Lu LP, Huang CH, Lai CS, Wang SY. 2020. Geranium and lemon essential oils and their active compounds downregulate angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain, in epithelial cells. *Plants.* 9(6):1–12. doi:10.3390/plants9060770.
- Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. 2018. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog.* 14(8):1–19. doi:10.1371/journal.ppat.1007236.
- Umadevi P, Manivannan S, Fayad AM, Shelvy S. 2020. In silico analysis of phytochemicals as potential inhibitors of proteases involved in SARS-CoV-2 infection. *J BiomolStruct Dyn.* 0(0):1–9. doi:10.1080/07391102.2020.1866669.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058.
- Wulanawati A, Noviardi H, Ibrohim MSM. 2018. Finding a potential bruceine d inhibitor for apoptotic resistance protein pancreatic cancer based on molecular docking. *Indones J Chem.* 18(3):566–572. doi:10.22146/ijc.25220.
- Yadav PK, Jaiswal A, Singh RK. 2020. In Silico Study on Spice-Derived Antiviral Phytochemicals Against SARS-CoV-2 TMPRSS2 Target. https://chemrxiv.org/articles/preprint/In_Silico_Study_on_Spice-Derived_Antiviral_Phytochemicals_Against_SARS-CoV-2_TMPRSS2_Target/12753539/files/24135803.pdf.
- Zhou Y, Vedantham P, Lu K, Agudelo J, Carrion R, Nunneley JW, Barnard D, Pöhlmann S, McKerrow JH, Renslo AR, et al. 2015. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res.* 116 February:76–84. doi:10.1016/j.antiviral.2015.01.011.

