

Research Article

Potensi Senyawa Nitazoxanide dan Arbidol sebagai Antivirus SARS-CoV-2 terhadap Reseptor NSP5 (7BQY dan 2GZ7) dan ACE2 (3D0G dan 1R4L)

Ami Fini Faqiha¹, Yen Yen Ari Indrawijaya¹, Arief Suryadinata¹, Muhammad Amiruddin¹ dan Roihatul Mutiah^{1*)}

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Indonesia

* Corresponding author: Roihatul Mutiah | Email: roiha@farmasi.uin-malang.ac.id; Tel.: +62 896 1526 1991

Received: 13 November 2021; Revised: 1 Maret 2022; Accepted: 19 Maret 2022; Published: 28 Maret 2022

Abstrak: *Nitazoxanide* merupakan obat *pro-drug* untuk *tizoxanide*. Obat tersebut diketahui memiliki aktivitas antivirus pada MERS-CoV. *Arbidol* memiliki aktivitas antivirus pada H3N2 HA yang memiliki kesamaan struktur dengan SARS-CoV-2. Reseptor target spesifik untuk obat-obat Anti SARS-CoV-2 saat ini adalah NSP5 (*nonstructural protein*) dan ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*). NSP5 memediasi replikasi dan transkripsi protein-protein virus, sedangkan ACE2 sebagai fasilitator transport asam amino dan reseptor tempat terikatnya SARS-CoV maupun SARS-CoV-2. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antivirus SARS-CoV-2 dari senyawa *Nitazoxanide* dan *Arbidol* secara *in silico*. Senyawa *nitazoxanide* dan *arbidol* dipreparasi terlebih dahulu dengan melakukan pengunduhan kode PDB ID, penyiapan struktur 2D dan 3D, penentuan *minimal energy*, pembuatan kode SMILES, serta prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas. Setelah dipreparasi, proses dilanjutkan dengan penambatan molekul menggunakan aplikasi PyRx-Vina®. Hasil *docking* dianalisis dengan perangkat lunak PyMOL® dan *Discovery Studio Visualizer*®. Hasil profil fisikokimia menunjukkan bahwa senyawa *arbidol* dan *nitazoxanide* telah memenuhi hukum lima Lipinski dan masing-masing senyawa memiliki nilai LD₅₀ sebesar 1350 mg/kg dan 340 mg/kg. Hasil penambatan senyawa uji dengan reseptor menghasilkan interaksi, yaitu ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatik. Interaksi *nitazoxanide* pada reseptor 2GZ7 serta *arbidol* pada reseptor 3D0G dan 1R4L menunjukkan perbedaan yang signifikan masing-masing terhadap *lopinavir* dan *chloroquine* dengan nilai $p < 0.05$ sehingga senyawa tersebut diprediksi memiliki potensi antivirus yang lebih baik.

Keywords: COVID-19, *Nitazoxanide*, *Arbidol*, Fisikokimia, Toksisitas, dan *In silico*

1. PENDAHULUAN

Pada 11 Februari 2020, WHO mengumumkan bahwa telah terjadi pandemi Coronavirus Disease (COVID-19) yang disebabkan oleh virus *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2) [1]. *Coronavirus* yang menjadi etiologi COVID-19 termasuk dalam genus *betacoronavirus*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa virus ini masuk dalam subgenus yang sama dengan *coronavirus* yang menyebabkan wabah *severe acute respiratory illness* (SARS) pada 2002-2004 silam, yaitu Sarbecovirus [2]. Proses replikasi virus COVID-19 yaitu SARS-CoV-2 berikatan dengan reseptor-reseptor dan membuat jalan masuk ke dalam sel, kemudian glikoprotein yang terdapat pada *envelope spike* virus akan berikatan dengan reseptor selular berupa ACE2 pada SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 akan melakukan duplikasi materi genetik dan mensintesis protein-protein yang dibutuhkan, kemudian membentuk virion baru yang muncul di permukaan sel [3].

Nitazoxanide merupakan salah satu obat yang diidentifikasi sebagai *small molecules* dalam *FDA-approved small molecules and biologics*. *Small molecule* dipilih agar dapat memastikan bahwa kriteria hukum lima Lipinski terpenuhi. Salah satu kriterianya, yaitu Berat Molekul (BM), yang mana, apabila nilai BM lebih dari 500 Da, obat tersebut tidak dapat berdifusi menembus membran sel [4].

Nitazoxanide menunjukkan konsentrasi IC₅₀ yang sangat tinggi, yaitu 0.83 µg/ml terhadap *middle east respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV) [5]. *Nitazoxanide* terbukti menurunkan ekspresi *proinflammatory cytokine* IL6 pada infeksi SARS-CoV-2 [6]. Hasil evaluasi genomik isolasi pada 10 pasien yang dilakukan untuk menentukan kesamaan antara SARS-CoV-2 dengan SARS-CoV dan MERS-CoV, menunjukkan hasil bahwa terdapat kesamaan (identik 88%) dengan *bat_derived severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronaviruses*, bat-SL-CoVZC45, dan bat-SLCoVZXC21. Ketiga virus tersebut memiliki kedekatan dengan SARS-CoV 79% dan dengan MERS-CoV 50% [7]. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan *molecular docking* dan didapatkan nilai afinitas terhadap masing-masing reseptor, -6,9 kcal/mmol untuk M^{PRO} (6LU7); -7,6 kcal/mmol untuk 3CLpro (1UK4); -7,5 kcal/mmol untuk ACE2 (6M0J); dan -7,6 kcal/mmol untuk NSP12 (6NUR) [8].

Salah satu obat *small molecule inhibitors* lainnya adalah *Arbidol*. *Arbidol* terbukti menghambat perubahan konformasi low-pH dari hemagglutinin (HA) dan menghalangi proses fusi [9]. Virus influenza (H3N2) HA memiliki kesamaan rangkaian atau struktur dengan SARS-CoV-2 *spike glycoprotein* [10,11]. Penelitian *molecular docking* telah dilakukan sebelumnya dan menunjukkan bahwa *arbidol* berinteraksi dengan reseptor ACE2 (6LZG) sehingga dapat menghambat fusi membran SARS-CoV-2 ke sel inang [12]. *Arbidol* maupun *nitazoxanide* belum terdaftar di Indonesia berdasarkan web BPOM (cekbpom.pom.go.id). Oleh karena itu, berdasarkan literature mengenai indikasi *arbidol* dan *nitazoxanide*, kedua senyawa tersebut dapat berpotensi sebagai obat baru di Indonesia.

Penelitian lain telah dilakukan pada 81 kasus (45 kasus kelompok *umifenovir/arbidol* dan 36 kasus kelompok kontrol) COVID-19 sedang atau berat dengan membandingkan hasil *CT scan* setelah pemberian dan hasil menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan perubahan nilai CT dalam 1 minggu sehingga menunjukkan bahwa pemberian *umifenovir* tidak memberikan hasil yang lebih baik atau tidak dapat mempersingkat lamanya pengobatan pada pasien COVID-19. Namun, karena penelitian ini adalah *single-centre* (studi retrospektif dengan jumlah *sample* yang sedikit), yang mana studi ini memiliki bias dan kesimpulannya bisa subjektif, maka perlu dilakukan verifikasi lebih lanjut dalam uji klinis acak terkontrol [13].

Pada penelitian ini digunakan dua reseptor target, yaitu NSP5 dan ACE2. Reseptor NSP5 (*nonstructural protein*) dikenal dengan M^{PRO} [14] dan *3-chymotrypsin like protease* (3CLpro) [15]. Reseptor ini dipilih karena mekanismenya dalam memediasi replikasi dan transkripsi protein virus [16]. Reseptor ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) memiliki tiga fungsi fisiologis, yaitu sebagai *negative regulator* pada sistem renin-angiotensin, fasilitator transport asam amino, dan reseptor tempat terikatnya SARS-CoV maupun SARS-CoV-2 [17].

Untuk menentukan keefektifan ligan yang diuji sebagai obat baru, dalam penelitian ini, dilakukan penambatan molekul, uji fisikokimia, dan toksisitas. Selain itu, dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* senyawa pembanding *lopinavir* terhadap *nitazoxanide* dan senyawa pembanding *chloroquine* terhadap *arbidol*. Penelitian ini penting untuk dilakukan karena dalam pengembangan obat COVID-19, diperlukan prediksi sifat (ADME), toksisitas, dan gambaran interaksi obat dengan

reseptor. Uji fisikokimia menggambarkan kelarutan/solubilitas suatu senyawa, larut atau tidaknya dalam air (hidrofobik)/lemak (hidrofilik), dan sifat kelarutan ini diperlukan untuk menembus membran sel oleh pergerakan obat dari konsentrasi tinggi ke rendah (difusi pasif) [4]. Toksisitas merupakan kemampuan suatu zat kimia untuk menimbulkan kerusakan pada organisme baik pada saat digunakan maupun pada saat berada dalam lingkungan [18].

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *PyRx* 0.8®, *Discovery Studio Visualizer*®, *PyMOL*®, dan *AutoDockTools-1.5.6*®.

2.2. Alat

Alat perangkat keras yang digunakan berupa satu set laptop dengan spesifikasi *processor* Intel® Celeron® CPU N3350 @ 1,10GHz, RAM sebesar 2 GB, serta perangkat lunak sistem operasi Windows 10 Pro 64-bit (10,0, Build 19041).

2.3. Preparasi Ligan dan Senyawa Pembanding

Preparasi sampel diawali dengan pengunduhan ligan dan senyawa pembanding dari situs Protein Data Bank <https://www.rcsb.org> dengan format *pdb. Untuk data visualisasi berupa struktur dua dimensi, senyawa digambar menggunakan program *ChemDraw* 19.0®. Proses persiapan ligan untuk menjadi berkas siap pakai dengan format struktur kimia 3D dilakukan menggunakan fasilitas konversi *AutoDockTools-1.5.6*®. Ligan yang digunakan adalah *nitazoxanide* dan *arbidol*, serta senyawa pembandingnya, yaitu *lopinavir* dan *chloroquine*. Kemudian, file kompleks ligan yang telah diunduh akan dibuka dalam format pdb. Langkah selanjutnya adalah preparasi ligan dengan eliminasi pelarut (air), semua residu, dan *small molecule*, kemudian disimpan dalam bentuk pdbqt (Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)).

2.4. Preparasi Reseptor

Preparasi reseptor diawali dengan pengunduhan struktur reseptor NSP5 (7BQY dan 2GZ7) dan ACE2 (3D0G dan 1R4L) pada situs Protein Data Bank (PDB) dalam format pdb. Preparasi protein reseptor dilakukan menggunakan aplikasi *PyMOL*®. Pada tahap ini, dilakukan eliminasi pelarut (air) dan *small molecule*. Setelah itu, file disimpan dalam bentuk pdbqt (Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)).

2.5. Penentuan Minimal Energy

Penentuan *minimal energy* dilakukan menggunakan program *Chem3D* 19.0®. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dengan metode Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), tetapi dilakukan pengunduhan struktur tiga dimensi terlebih dahulu dari situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format *sdf. Setelah itu, dilakukan kalkulasi *minimal energy* melalui *Chem3D* 19.0® dengan cara *import file > calculation > MMFF94 > Perform MMFF94 Minimization*.

2.6. Penentuan Grid Box Center dan Sizes

Penentuan *grid box center* dan *sizes* dilakukan dengan *blind docking tools* secara otomatis menggunakan aplikasi *CB-Dock*®. *CB-Dock*® memprediksi daerah pengikatan reseptor, menghitung *center* dan *sizes* dengan pendekatan deteksi *cavity* berbasis *curvature* [19]. Ligan dan reseptor dengan format pdb diunggah dalam situs <http://cao.labshare.cn/cb-dock/> dan kemudian dilakukan kalkulasi. Hasil yang didapatkan berupa interaksi antara ligan dan reseptor dalam bentuk 3D dan tabel berisikan nilai *vina score*, ukuran *cavity*, *center*, dan *size*. Hasil tersebut kemudian disimpan atau disalin ke dalam Microsoft Word.

2.7. Validasi Metode

Proses validasi dalam uji *in silico* ini dilakukan melalui *re-docking native ligand* yang telah diunduh melalui situs Protein Data Bank <https://www.rcsb.org> dan ada beberapa *native ligand* yang dipreparasi menggunakan aplikasi Discovery Studio Visualizer®. Validasi reseptor dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan menggunakan aplikasi PyRx-Vina®. Parameter yang diamati pada tahap ini adalah nilai RMSD (*root mean square deviation*) yang dihasilkan dari *re-docking native ligand* dengan proteinnya [20]. Metode dikatakan valid dan baik apabila nilai RMSD yang dihasilkan < 2 Å [21].

2.8. Proses Penambatan

Proses penambatan dilakukan antara ligan dan senyawa pembanding pada masing-masing reseptor melalui perangkat lunak PyRx-Vina®. Reseptor maupun senyawa yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam aplikasi PyRx 0.8® dalam bentuk pdbqt. Reseptor kemudian diset menjadi makromolekul, sedangkan senyawanya diset menjadi ligan. Ligan dan reseptor akan tersimpan di komputer secara otomatis dan akan tertera di *navigator* bagian "AutoDockTools-1.5.6®". Reseptor dan ligan yang telah tersimpan tadi dimasukkan pada *control* bagian Vina Wizard pilihan *select molecule*. Kemudian, dipilih tombol *forward* dan diatur *grid box center* dan *sizes* dari hasil aplikasi CB-Dock®. Lalu, dilakukan pencatatan informasi *vina search space* (*center* dan *dimension*), dan data ini digunakan dalam kebutuhan *administrative*, validasi, dan saat analisis posisi relatif. Selanjutnya, dipilih *Run Vina* dan didapatkan hasil berupa nilai afinitas dan nilai RMSD untuk kebutuhan validasi.

2.9. Prediksi Sifat Fisikokimia dan Toksisitas

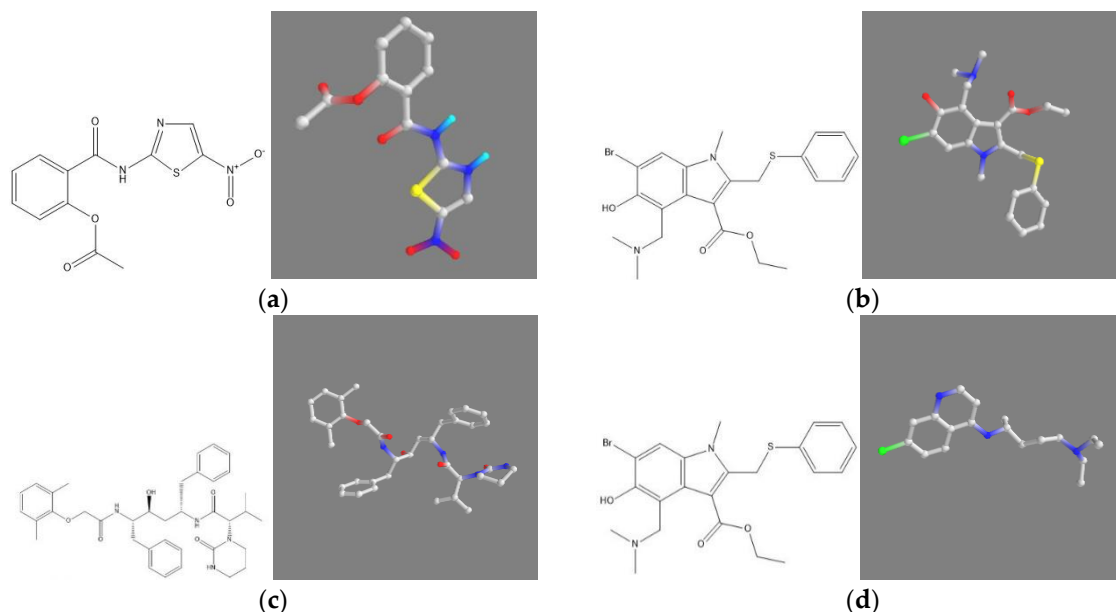
Prediksi sifat fisikokimia ligan dilakukan dengan mengecek Kode SMILE ligan dan senyawa pembanding yang didapatkan dari aplikasi ChemDraw 19.0®. Kode SMILE diunggah ke dalam situs SwizzADME <http://www.swissadme.ch/>. Hasil dianalisis dengan berlandaskan hukum lima Lipinski. Lipinski ini berupa lima aturan yang harus dipenuhi ligan agar dapat dilanjutkan ke tahap simulasi *docking*. Senyawa dikatakan tidak memenuhi aturan Lipinski apabila terdapat kesalahan lebih dari satu kriteria [4], dengan cara analisis Berat Molekul (BM), logaritma koefisien partisi (Log P (XLogP3)), *hydrogen bond acceptors* (HBA), *hydrogen bond donors* (HBD), dan *molar refractivity*. Untuk memprediksi toksisitas ligan berdasarkan nilai LD₅₀, *skin sensitization*, *Ames toxicity*, dan *hepatotoxicity*, dilakukan penginputan code SMILES yang telah disiapkan tadi melalui situs pkCSM *online tools* <https://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction> dan situs Prottox II *online tools* https://tox-new.charite.de/prottox_II/ untuk memprediksi nilai LD₅₀.

3. HASIL DAN DISKUSI

Struktur kimia senyawa nitazoxanide dan arbidol serta senyawa pembanding lopinavir dan chloroquine dapat dilihat pada Gambar 1. Penentuan minimal energy pada senyawa nitazoxanide dan arbidol dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan perhitungan yang lebih akurat tentang molekul dan konformasi akhir yang lebih stabil [22]. Hasil rerata minimal yang didapatkan pada senyawa nitazoxanide dan arbidol masing-masing sebesar 12.148 kkal/mol dan 72.0405667 kkal/mol. Energi tersebut merupakan energi seminimal mungkin pada bentuk stereokimia dan bentuk paling stabil untuk dilakukan docking.

Proses validasi dilakukan dengan tujuan untuk memastikan metode yang digunakan tervalidasi dan didapatkan metode yang baik sehingga dapat dilanjutkan pada tahap penelitian berikutnya. Parameter yang diamati pada tahap ini adalah nilai RMSD yang dihasilkan dari *re-docking native ligand* dengan proteinnya [21]. RMSD adalah proses pengukuran dua pose dengan membandingkan posisi atom antara struktur eksperimental dengan struktur protein yang di-*docking*

[23]. Metode dikatakan valid dan baik apabila nilai RMSD yang dihasilkan $< 2 \text{ \AA}$ [21]. Hasil validasi *docking* dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Struktur kimia senyawa (a) *nitazoxanide* dan (b) *arbidol*, serta senyawa perbandingan (c) *lopinavir* dan (d) *chloroquine*

PyRx-Vina® menghasilkan dua jenis RMSD yaitu RMSD *lower* dan RMSD *upper*. Namun, yang dianalisis hanyalah nilai dari RMSD *lower*, karena RMSD *lower* didapatkan dari pencarian semua kemungkinan atom dalam molekul simetris [24]. Artinya, RMSD *lower* dihitung dari pendekatan konformasi *native ligand* dalam semua simetri. Menurut Meli dan Biggin, atom yang tidak dapat dibedakan akan memberikan hasil yang benar dengan mengoreksi simetri sehingga nilai RMSD *lower* dapat lebih tepat [25].

Tabel 1. Hasil validasi *docking* dari nilai RMSD

Reseptor	Native Ligand	RMSD Lower (Å)	RMSD Upper (Å)
7BQY	Native ligan 1	1.751 ± 0.060	3.469 ± 0.736
2GZ7	Native ligan 2	0.185 ± 0.009	2.950 ± 0.093
3D0G	Native ligan 3	1.846 ± 0.047	2.202 ± 0.079
	Native ligan 4	1.852 ± 0.029	5.257 ± 0.034
1R4L	Native ligan 5	1.356 ± 0.668	2.279 ± 0.458
	Native ligan 3	1.805 ± 0.157	2.276 ± 0.214

Native ligan 1 : *n*-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alaninyl-L-valyl-n-1--((1*r*,2*z*)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[(3*r*)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-L-leucinamide

Native ligan 2 : 2-[(2,4-dichloro-5-methylphenyl) sulfonyl]-1,3- dinitro-5-(trifluoromethyl) Benzene

Native ligan 3 : 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose

Native ligan 4 : 2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranose

Native ligan 5 : (s,s)-2-[1-carboxy-2-[3-(3,5-dichloro-benzyl)-3*h*-imidazol-4-yl]-ethylamino]-4-methyl-pentanoic acid

Berdasarkan proses validasi, diperoleh nilai RMSD. Nilai tersebut berbeda, kemungkinan karena molekul yang dianalisis adalah molekul yang simetris sehingga potensi substrukturnya sesuai dengan posisi dalam molekul (tidak semua dengan posisi yang sama) [24]. Keenam *native ligand* diketahui memenuhi standar validasi dengan nilai RMSD < 2 Å sehingga *docking* senyawa uji pada reseptor masing-masing dapat dilakukan.

Hasil dari *molecular docking* molekul pada penelitian meliputi nilai *binding affinity* beserta RMSD-nya. Afinitas pengikatan adalah kekuatan interaksi antara dua atau lebih molekul yang terikat secara reversibel [26]. Menurut Adelina, skor merupakan parameter kekuatan afinitas pengikatan ligan uji terhadap reseptor [27]. Makin stabilnya interaksi ligan-protein akan dicerminkan dengan makin rendahnya skor (minus). Apabila ikatan ligan dengan reseptor makin stabil, dapat diprediksi bahwa aktivitasnya juga makin besar [28]. Hasil *docking* dengan menggunakan aplikasi PyRx-Vina® pada senyawa *nitazoxanide*, senyawa pembanding *lopinavir*, dan *native ligand* terhadap reseptor 7BQY dan 2GZ7, maupun senyawa *arbidol*, senyawa pembanding *chloroquine*, dan *native ligand* terhadap reseptor 3D0G dan 1R4L ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil *docking* senyawa uji, senyawa pembanding, dan *native ligand* terhadap masing-masing reseptor

Reseptor	Senyawa	Afinitas (kcal/mol)	Center			Size (x*y*z)
			X	Y	Z	
NSP5 (7BQY)	<i>Nitazoxanide*</i>	-5.7 ± 0	-6 ± 0	2 ± 0	9.7 ± 0.929	21*21*21
	<i>Lopinavir</i> (Senyawa Pembanding)	-5.633 ± 0.058	9 ± 0	3 ± 0	9.2 ± 1.701	26*26*26
	Native ligan 1	-5.467 ± 0.208	9 ± 0	3 ± 0	5.6 ± 3.650	29*29*29
NSP5 (2GZ7)	<i>Nitazoxanide**</i>	-6.667 ± 0.153	-1 ± 0	37 ± 0.058	14.4 ± 2.223	21*21*21
	<i>Lopinavir</i> (Senyawa Pembanding)	-7.8 ± 0.1	-1 ± 0	-37 ± 0	15 ± 4.114	26*26*26
	Native ligan 2	-5.6 ± 0	-23 ± 0.058	-40 ± 0.058	14.1 ± 0.305	21*21*21
ACE2 (3D0G)	<i>Arbidol***</i>	-6.567 ± 0.208	19 ± 0.058	39 ± 0.058	68.4 ± 0.889	22*22*22
	<i>Chloroquine</i> (Senyawa Pembanding)	-4.1 ± 0.1	47 ± 0.058	-11 ± 0.058	77.6 ± 3.980	24*24*24
	Native ligan 3	-3.367 ± 0.058	61 ± 0	17 ± 0	68.2 ± 0.346	18*32*18
ACE2 (1R4L)	Native ligan 4	-5.3 ± 0.1	19 ± 0	39 ± 0	76.4 ± 0.265	18*18*18
	<i>Arbidol****</i>	-8.1 ± 0	46 ± 0	5 ± 0	28.1 ± 0	35*22*35
	<i>Chloroquine</i> (Senyawa Pembanding)	-6.667 ± 0.115	46 ± 0	5 ± 0	18.7 ± 2.285	35*24*35
	Native ligan 5	-9.167 ± 0.058	46 ± 0	2 ± 0	26.7 ± 1.4	35*23*35
	Native ligan 3	-6.267 ± 0.058	46 ± 0	5 ± 0	27.3 ± 0.153	35*18*35

Nilai signifikansi antara senyawa uji dengan senyawa pembanding pada tiap-tiap reseptor

* : 0.114 kkal/mol

** : 0.000 kkal/mol

*** : 0.000 kkal/mol

**** : 0.034 kkal/mol

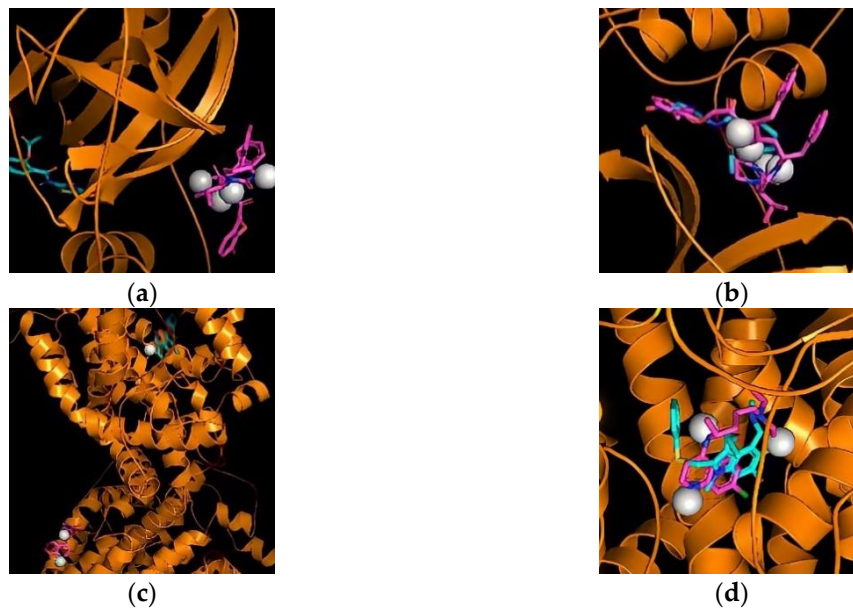
Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat senyawa dengan *native* ligan yang memiliki data replikasi *binding affinity* yang berbeda dan perbedaan ini diprediksi karena adanya perbedaan pengikatan ligan dengan asam amino pada reseptor [29]. Pada reseptor 7BQY, *nitazoxanide* memperoleh nilai *binding affinity* sebesar -5.7 kcal/mol, *lopinavir* sebesar -5.633 kcal/mol, dan *native ligand* sebesar -5.467 kcal/mol. Dari nilai tersebut, diketahui *nitazoxanide* memiliki nilai *binding affinity* paling baik sehingga senyawa tersebut lebih efektif (sebagai obat) dan mampu menghambat proses replikasi virus SARS-CoV-2 lebih baik. Sementara itu, pada reseptor 2GZ7, *nitazoxanide* memperoleh nilai *binding affinity* sebesar -6.667 kcal/mol, *lopinavir* sebesar -7.8 kcal/mol, dan *native ligand* sebesar -5.6 kcal/mol. Dari nilai tersebut, diketahui *lopinavir* memiliki nilai *binding affinity* paling baik sehingga senyawa pembanding tersebut lebih efektif (sebagai obat) dan mampu menghambat proses replikasi virus SARS-CoV-2 lebih baik. Namun, *nitazoxanide* memiliki nilai *binding affinity* lebih baik daripada *native ligand*.

Pada reseptor 3D0G, *arbidol* memperoleh nilai *binding affinity* sebesar -6.567 kcal/mol, *chloroquine* sebesar -4.1 kcal/mol, *native ligand* pertama sebesar -3.367 kcal/mol, dan *native ligand* kedua sebesar -5.3 kcal/mol. Dari nilai tersebut, diketahui *arbidol* memiliki nilai *binding affinity* paling baik sehingga senyawa tersebut diprediksi lebih efektif sebagai obat dan mampu menghambat perlekatan virus ke reseptor ACE2 lebih baik. Sementara itu, *native ligand* kedua diketahui memiliki nilai *binding affinity* yang lebih baik daripada *native ligand* pertama. Lebih lanjut, pada reseptor 1R4L, *arbidol* memperoleh nilai *binding affinity* sebesar -8.1 kcal/mol, *chloroquine* sebesar -6.667 kcal/mol, *native ligand* pertama sebesar -9.167 kcal/mol, dan *native ligand* kedua sebesar -6.267 kcal/mol. Dari nilai tersebut, diketahui *native ligand* pertama dengan nama (*s,s*)-2-(1-carboxy-2-[3-(3,5-dichloro-benzyl)-3*h*-imidazol-4-yl]-ethylamino)-4-methyl-pentanoic acid memiliki nilai *binding affinity* paling baik sehingga senyawa tersebut lebih efektif (sebagai obat) dan mampu menghambat perlekatan virus ke reseptor ACE2 lebih baik. Namun, *arbidol* memiliki nilai *binding affinity* lebih baik daripada senyawa pembanding, yaitu *chloroquine*.

Ikatan hidrogen adalah ikatan yang terjadi antara atom hidrogen (H) pada molekul yang satu dengan salah satu unsur atom (F, O, N) pada molekul lainnya, yang merupakan gaya dipol-dipol paling kuat [30]. Dalam sistem biologis, atom nitrogen atau oksigen merupakan donor serta akseptor, khususnya atom dalam gugus amina (-NH₂) dan hidroksil (-OH). Karena bersifat polar antara ikatan N-H dan O-H, atom H-nya dapat berikatan hidrogen dengan atom akseptor [31]. Ikatan hidrogen akan stabil dan memiliki ikatan yang kuat apabila memiliki panjang ikatan < 2.7 Å [32]. Makin kecil jarak ikatan hidrogen antara ligan dengan gugus asam, nilai afinitasnya makin besar [33]. Makin kecil jarak ikatan, maka ikatan makin kuat dan tidak mudah terlepas, begitu pula sebaliknya [34].

Ikatan hidrofobik merupakan molekul nonpolar tidak mengandung ion yang terhidrasi atau memiliki momen dipol. Hal tersebut terjadi karena dalam air, molekul tersebut tidak larut atau hampir tidak larut [31]. Ikatan ini penting pada proses penggabungan daerah nonpolar ligan dengan daerah nonpolar reseptor. Daerah nonpolar molekul yang tidak larut air dan molekul air yang berada disekelilingnya akan bergabung melalui ikatan hidrogen membentuk struktur *quasi-crystalline* (*icebergs*) [35]. Ikatan hidrofobik merupakan parameter dari kuatnya interaksi asam amino antara ligan dengan reseptor yang berguna dalam membantu mempertahankan konformasi pengikatan [32].

Ikatan elektrostatik menggambarkan gaya antara atom polar dan biasanya diwakili oleh potensial Coulomb. Umumnya, terdapat dua pendekatan fungsi penilaian untuk interaksi ikatan hidrogen: (i) dengan menggunakan parameter berbasis medan gaya spesifik yang terkait dengan van der Waals dan potensi energi elektrostatik; (ii) dengan menggunakan suku arah, di mana kontribusi ikatan hidrogen merupakan fungsi dari deviasi parameter geometri dari ikatan hidrogen ideal [36]. Interaksi hidrofobik dan interaksi elektrostatik dapat meningkatkan kestabilan konformasi [37]. Jenis interaksi dalam bentuk tiga dimensi ditunjukkan pada Gambar 2.

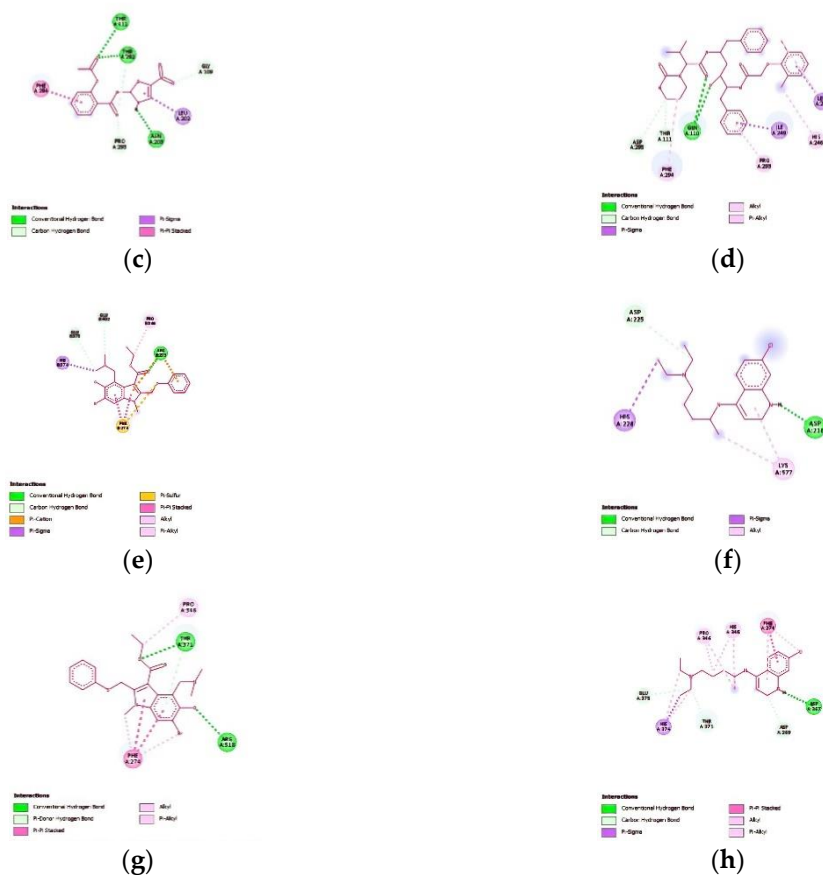


Gambar 2. Bentuk tiga dimensi (a) *nitazoxanide*(cyan)-*lopinavir*(ungu) terhadap reseptor 7BQY (b) *nitazoxanide*(cyan)-*lopinavir*(ungu) terhadap reseptor 2GZ7 (c) *arbidol*(cyan)-*chloroquine*(ungu) terhadap reseptor 3D0G (d) *arbidol*(cyan)-*chloroquine*(ungu) terhadap reseptor 1R4L

Hasil visualisasi 3D menunjukkan *nitazoxanide-lopinavir* pada reseptor 2GZ7 dan *arbidol-chloroquine* pada reseptor 1R4L memiliki posisi penambatan yang sama sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa uji memiliki aktivitas penghambatan replikasi (2GZ7) atau perlekatan (1R4L) virus SARS-CoV-2. Sementara itu, *nitazoxanide-lopinavir* pada reseptor 7BQY dan *arbidol-chloroquine* pada reseptor 3D0G tidak memiliki kemiripan posisi dan sudut dari setiap atomnya. Kemiripan pose ligan dengan senyawa perbandingan dapat dipengaruhi dari nilai RMSD, yang mana nilai RMSD yang mendekati nol akan menyebabkan kemiripan pose antara keduanya [34]. Jenis interaksi dalam bentuk tiga dimensi ditunjukkan pada Gambar 3.



...lanjutan Gambar 3



Gambar 3. Bentuk dua dimensi (a) *Nitazoxanide-7BQY* (b) *Lopinavir-7BQY* (c) *Nitazoxanide-2GZ7* (d) *Lopinavir-2GZ7* (e) *Arbidol-3D0G* (f) *Chloroquine-3D0G* (g) *Arbidol-1R4L* (h) *Chloroquine-1R4L*

Gambar 3 menunjukkan garis-garis putus. Garis putus-putus tersebut merupakan jarak ikatan [34]. Ikatan hydrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau lime dan hijau telur asin; interaksi elektrostatis ditandai dengan garis putus-putus berwarna oranye serta interaksi hidrofobik ditandai dengan garis putus-putus berwarna ungu, neon pink dan pink.

Pada Gambar 3(a) dan 3(b), terlihat senyawa *nitazoxanide* lebih stabil, didukung oleh adanya ikatan hydrogen dengan asam amino Asn 151, Arg 298, Thr 111, dan Asp 295; dan interaksi hidrofobik dengan asam amino Ile 106 dan Val 104. Sementara, senyawa pembanding *lopinavir* hanya memiliki dua ikatan hydrogen dengan asam amino Lys 5 dan Lys 137; dan interaksi hidrofobik dengan asam amino Arg 4. Sementara itu, pada Gambar 3(c) dan 3(d), terlihat senyawa pembanding *lopinavir* lebih stabil, didukung oleh adanya ikatan hydrogen dengan asam amino Gln 110 (2), Thr 111, dan Asp 295; dan interaksi hidrofobik dengan asam amino Leu 202 (2), Ile 249, His 246, Phe 294, dan Pro 293. *Nitazoxanide* memiliki ikatan hydrogen dengan asam amino Thr 111, Thr 292, Asn 203, Gly 109, dan Pro 293; dan hanya memiliki dua interaksi hidrofobik dengan asam amino Leu 202 dan Phe 294.

Pada Gambar 3(e) dan 3(f), terlihat senyawa *arbidol* lebih stabil, didukung oleh adanya ikatan hydrogen dengan asam amino Arg 273, Glu 375, dan Glu 402; interaksi hidrofobik dengan asam amino His 374, Phe 274 (3), dan Pro 346; dan interaksi elektrostatis dengan asam amino Arg 273 (2). Sementara itu, *chloroquine* hanya memiliki dua ikatan hydrogen dengan asam amino Asp 216 dan Asp 225; dan hanya memiliki tiga interaksi hidrofobik dengan asam amino His 228 dan Lys 577 (2). Selanjutnya, pada Gambar 3(g) dan 3(h), terlihat senyawa *chloroquine* lebih stabil, didukung oleh adanya ikatan hydrogen dengan asam amino Asp 367, Asp 269, Thr 371, dan Glu 375; dan interaksi hidrofobik dengan asam amino His 374, Phe 274 (3), dan Pro 346 (2). Sementara, *arbidol* hanya

memiliki tiga ikatan hidrogen dengan asam amino Thr 371 (2) dan Arg 518; dan hanya memiliki lima interaksi hidrofobik dengan asam amino Phe 274 (4) dan Pro 346.

Prediksi sifat fisikokimia dilakukan dengan mengecek ligan *nitazoxanide* dan *arbidol*, serta senyawa pembanding *lopinavir* dan *chloroquine*. Senyawa dikatakan tidak memenuhi apabila terdapat kesalahan lebih dari satu kriteria [4], dengan cara analisis Berat Molekul (BM), logaritma koefisien partisi (Log P (XLogP3)), *hydrogen bond acceptors* (HBA), *hydrogen bond donors* (HBD), dan *molar refractivity*. SwissADME dipilih karena platform ini tidak mengeluarkan biaya dan berfungsi dalam menghitung sifat molekuler ligan berdasarkan aturan lima Lipinski [38]. Dengan menggunakan alat ini, profil farmakokinetik senyawa seperti absorpsi, distribusi, dan metabolisme ligan dapat dievaluasi [39]. Hasil screening sifat fisikokimia pada senyawa *nitazoxanide* dan *arbidol*, serta pada senyawa pembanding *lopinavir* dan *chloroquine* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pembacaan sifat fisikokimia dengan menerapkan hukum lima Lipinski terhadap senyawa protein reseptor

Senyawa	Ketentuan Lima Lipinski					Hasil
	BM (Dalton)	LogP	HBD	HBA	MR	
<i>Nitazoxanide</i>	307.28	2.04	1	6	76.65	Ya
<i>Arbidol</i>	477.41	4.43	1	4	122.69	Ya
<i>Lopinavir</i>	628.80	5.92	4	5	187.92	Tidak
<i>Chloroquine</i>	319.87	4.63	1	2	97.41	Ya

BM : Berat Molekul < 500 Dalton

LogP : Koefisien Partisi < 5

HBD : *Hydrogen Bond Donor* < 5

HBA : *Hydrogen Bond Acceptor* < 10

MR : *Molar Refractivity* (40 < MR < 130)

Dari tabel 3, senyawa *nitazoxanide*, *arbidol*, dan *chloroquine* sama-sama memiliki berat molekul yang kurang dari 500 Dalton, nilai LogP kurang dari 5, nilai *hydrogen bond donor* kurang dari 5, nilai *hydrogen bond acceptor* kurang dari 10, nilai *molar refractivity* diantara 40 dan 130. Dengan demikian, senyawa *arbidol* dan *chloroquine* memenuhi hukum lima Lipinski dan dapat dikatakan mudah untuk diabsorpsi dan memiliki permeabilitas yang tinggi. Oleh karenanya, senyawa di atas dapat diadministrasikan secara oral [40].

Sementara itu, *lopinavir* tidak memenuhi hukum lima Lipinski karena terdapat tiga kriteria yang tidak terpenuhi, yaitu nilai berat molekulnya sebesar 628.80 Da (BM < 500 Da), nilai LogP sebesar 5.92, dan nilai *molar refractivity*-nya sebesar 187.92 (40 < MR < 130). Senyawa dapat dikatakan tidak memenuhi apabila terdapat lebih dari satu kriteria yang menyimpang. Syarat nilai LogP (XLogP3) adalah -0.4-5. Makin besar atau positif nilai log P, Makin hidrofobik molekul tersebut. Jika sifatnya terlalu hidrofobik, tingkat toksisitasnya juga akan tinggi karena akan tertahan lebih lama pada lipid *bilayer* atau dasar struktur membran sel dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang [4]. *Molar refractivity* yang tidak sesuai dengan persyaratan akan menyebabkan senyawa nonpolar tidak dapat membentuk momentum sehingga tidak dapat berikatan dengan reseptor, dan sifat polarnya tidak dapat mengekskresikan sisa dari metabolisme senyawa [41]. Oleh karenanya, senyawa *lopinavir* akan sulit diabsorpsi dan permeabilitasnya rendah.

Toksistas merupakan kemampuan suatu zat kimia untuk menimbulkan kerusakan pada organisme baik pada saat digunakan atau pada saat berada dalam lingkungan [18]. Uji toksistas dilakukan apabila telah diketahui bahwa senyawa memiliki aktivitas prediksi yang lebih baik dibandingkan senyawa pembanding berdasarkan persamaan Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA) [42]. Macam-macam penilaian toksistas yang dilakukan pada uji ini, yaitu LD_{50} , *skin sensitization*, *Ames toxicity*, dan *hepatotoxicity*. Globally Harmonized System mengklasifikasikan LD_{50} menjadi 6 kelas, yaitu kelas I (fatal jika tertelan): $LD_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$; kelas II (fatal jika tertelan): $5 < LD_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$; kelas III (beracun jika tertelan): $50 < LD_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$; kelas IV (berbahaya jika tertelan): $300 < LD_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$; kelas V (bisa berbahaya jika tertelan): $2000 < LD_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$; dan kelas VI (tidak beracun): $LD_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$ [43]. Hasil dari prediksi toksistas ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil prediksi sifat toksistas senyawa protein *nitazoxanide* dan *arbidol*, serta pada senyawa pembanding *lopinavir* dan *chloroquine* menggunakan pkCSM Online Tools dan Prottox II Online Tools senyawa protein reseptor

Senyawa	Kategori Toksistas				Hasil (GHS)
	LD_{50} (mg/kg) *	<i>skin sensitization</i> **	<i>Ames toxicity</i> * *	<i>hepatotoxicity</i> **	
<i>Nitazoxanide</i>	1350	Tidak	Ya	Ya	4
<i>Arbidol</i>	340	Tidak	Tidak	Tidak	4
<i>Lopinavir</i>	5000	Tidak	Tidak	Ya	5
<i>Chloroquine</i>	750	Tidak	Ya	Ya	4

* Dengan Prottox II Online Tools

** Dengan pkCSM Online Tools

Berdasarkan tabel 4, hasil yang didapatkan untuk semua senyawa adalah terbukti tidak memiliki toksistas pada analisis *skin sensitization* sehingga semua senyawa tidak menimbulkan sensitisasi pada kulit. Untuk hasil uji *Ames toxicity*, terdapat dua senyawa yang positif, yaitu *nitazoxanide* dan *chloroquine*, yang artinya, kedua senyawa tersebut bersifat mutagenik dan oleh sebab itu, dapat bertindak sebagai karsinogen [44]. Kemudian, uji *hepatotoxicity* menunjukkan hasil positif pada senyawa protein *nitazoxanide* dan senyawa pembanding *lopinavir* dan *chloroquine* sehingga dapat diprediksi bahwa ketiga senyawa tersebut toksik terhadap hepar. Selain itu, untuk toksistas per oral pada hewan coba (LD_{50}), dilakukan pengujian dan pengklasifikasian toksistas melalui situs Prottox II Online Tools. *Lethal dose 50* (LD_{50}) merupakan data statistik suatu besaran untuk menyatakan dosis tunggal suatu senyawa yang diperkirakan menyebabkan kematian atau menimbulkan efek toksik pada 50% hewan coba setelah perlakuan. Makin kecil nilai toksik, makin toksik suatu senyawa, demikian juga dengan sebaliknya [45,18]. Dari pengujian tersebut, dapat diprediksi senyawa *nitazoxanide* memiliki nilai LD_{50} pada hewan coba sebesar 1350 mg/kg, sedangkan senyawa *arbidol* sebesar 340 mg/kg dan senyawa pembanding *chloroquine* sebesar 750 mg/kg sehingga ketiga senyawa tersebut diklasifikasikan pada kelas 4 GHS ($300 < LD_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$), yang berarti senyawa tersebut memiliki efek toksistas yang relatif rendah [46]. Sementara itu, senyawa pembanding *lopinavir* diprediksi memiliki nilai sebesar 5000 mg/kg sehingga senyawa tersebut diklasifikasikan pada kelas 5 GHS ($2000 < LD_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$), yang artinya mempunyai efek toksistas

akut yang rendah. Makin besar nilai toksik, makin tidak toksik suatu senyawa, demikian juga dengan sebaliknya [45,18].

4. KESIMPULAN

Senyawa *nitazoxanide* pada reseptor 7BQY tidak memiliki perbedaan nilai *binding affinity* yang signifikan dengan senyawa pembanding *lopinavir*, sedangkan *nitazoxanide* pada reseptor 2GZ7 dan *arbidol* pada reseptor 3D0G dan 1R4L memiliki perbedaan nilai *binding affinity* yang signifikan masing-masing terhadap senyawa pembanding *lopinavir* dan *chloroquine*. Namun, hasil *binding affinity arbidol* kurang efektif daripada *native* ligan dari reseptor 1R4L, sehingga penelitian selanjutnya direkomendasikan untuk menguji *arbidol* pada reseptor ACE2 dengan kode yang lain. Untuk mengembangkan potensi antivirus SARS-CoV-2, ligan perlu diamati melalui analisis dinamika molekuler pada tahap selanjutnya.

Konflik kepentingan: Tidak terdapat konflik kepentingan pada penelitian ini.

Referensi

1. World Health Organization. Report Of The Who On Coronavirus Disease 2019 (COVID-19); World Health Organization: Geneva, 2020.
2. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020, 382(8), 727-33. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
3. Susilo, A.; Rumende, C. M.; Pitoyo, C. W.; Santoso, W. D.; Yulianti, M.; Herikurniawan, H.; Sinto, R.; Singh, G.; Nainggolan, L.; Nelwan, E. J.; Chen, L. K.; Widhani, A.; Wijaya, E.; Wicaksana, B.; Maksum, M.; Annisa, F.; Jasirwan, C. O. M.; Yuniastuti, E. Coronavirus Disease 2019: Tinjauan Literatur Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia* 2020, 7 (1).
4. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. Experimental and corlianimputational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 23 (1± 3), 3 ±25.
5. Rossignol, J. F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Infect. Public Health* 2016, 9 (3), 227–230.
6. Risner, K. H.; Tieu, K. V.; Wang, Y.; Bakovic, A.; Alem, F.; Bhalla, N.; Nathan, S.; Conway, D. E.; Macklin, P.; Narayanan, A. 2020. Maraviroc inhibits SARS-CoV-2 multiplication and s-protein mediated cell fusion in cell culture. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.246389>
7. Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; Bi, Y.; Ma, X.; Zhan, F.; Wang, L.; Hu, T.; Zhou, H.; Hu, Z.; Zhou, W.; Zhao, L.; Chen, J.; Meng, Y.; Wang, J.; Lin, Y.; Yuan, J.; Xie, Z.; Ma, J.; Liu, W. J.; Wang, D.; Xu, W.; Holmes, E. C.; Gao, G. F.; Wu, G.; Chen, W.; Shi, W.; Tan, W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020, 395, 565-74.
8. Oliveira, M. D. L. de; Oliveira, K. M. T. de. Comparative Docking of SARS-CoV-2 Receptors Antagonists from repurposing drugs. *ChemRxiv*, Cambridge Open Engage, Cambridge, 2020. DOI: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12044538.v4>.
9. Kadam, R. U.; Wilson, I. A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2017, 114 (2), 206–214.
10. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020, 367 (6483), 1260–1263.
11. Vankadari, N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020, 56, 105998.
12. Padhi, A. K.; Seal, A.; Khan, J. M.; Ahamed, M.; Tripathi, T. Unraveling the mechanism of Arbidol binding and inhibition of SARS-CoV-2: Insights from atomistic simulations. *European Journal of Pharmacology* 2021, 5 (894), 173836.

13. Lian, N.; Xie, H.; Lin, S.; Huang, J.; Zhao, J.; Lin, Q. Umifenovir treatment is not associated with improved outcomes in patients with coronavirus disease 2019: a retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection* 2020, 26, 917-921
14. Wu, C.; Liu, Y.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhong, W.; Wang, Y.; Wang, Q.; Xu, Y.; Li, M.; Li, X.; Zheng, M.; Chen, L.; Li, Hua. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2020, 10 (5), 766-788.
15. Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science* 2020, 368 (6498), 409-412. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
16. Jin, Z.; Du, X.; Xu, Y.; Deng, Y.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; Duan, Y.; Jing Yu, Lin Wang, Kailin Yang, Fengjiang Liu, Rendu Jiang, Xinglou Yang, Tian You, Xiaoce Liu, Xiuna Yang, Fang Bai, Hong Liu, Xiang Liu, Luke W. Guddat, Wenqing Xu, Gengfu Xiao, Chengfeng Qin, Zhengli Shi, Hualiang Jiang, Zihao Rao, Haitao Yang. Structure of Mpro 1 from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *bioRxiv* 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.964882>.
17. Gheblawi, M.; Wang, K.; Viveiros, A.; Nguyen, Q.; Zhong, J.; Turner, A. J.; Raizada, M. K.; Grant, M. B.; Oudit, G. Y. AngiotensinConverting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circulation research* 2020, 126, 1456-1474. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015>.
18. Priyanto. Toksikologi: Mekanisme, Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko; Leskonfi: Depok, Indonesia, 2009.
19. Trott, O.; Olson A. J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2009, 31, 455-61.
20. Putri, P. V. P.; Susanti, N. M. P.; Laksmiani, N. P. L. Senyawa Kuersetin sebagai Agen Antikanker Kolorektal Secara In Silico. *Journal of Chemistry* 2019, 13 (2), 166 - 171.
21. Khelfaoui, Hadjer; Harkati, D.; Saleh, B. A. Molecular docking, molecular dynamics simulations and reactivity, studies on approved drugs library targeting ACE2 and SARS-CoV-2 binding with ACE2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2021, 39 (18), 7246-7262. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803967>.
22. Carvalho, I.; Monica T. P.; Áurea D. L. B.; Lilian S. C. B. Introduction to molecular modeling of drugs in the experimental course of pharmaceutical chemistry. *New Chemistry* 2003, 26 (03), 1-38.
23. Lestari, T. Studi Interaksi Senyawa Turunan 1,3-Dibenzoilthiourea sebagai Ribonukleotida Reduktase Inhibitor. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2015, 7, 163 - 169.
24. Bell, E. W.; Zhang, Yang. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform* 2019, 11 (40). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>.
25. Meli, R.; Biggin, P. C. Spyrmsd: Symmetry-Corrected RMSD Calculations in Python. *J Cheminform* 2020, 12 (49). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00455-2>.
26. Kastritis, P. L.; Bonvin, A. M. J. J. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *J R Soc Interface* 2012, 10, 20120835. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0835>.
27. Adelina, R. Uji Molecular Docking Annomuricin E dan Muricapentocin pada Aktivitas Antiproliferasi. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 2014, 12 (1). ISSN 1693-1831.
28. Hardjono, S. Modifikasi Struktur 1-(Benzoiloksi)urea dan Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Sitotoksiknya. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya, 2012.
29. Frimayanti, N.; Djohari, M.; Khusnah, A. N. Molekular Docking Senyawa Analog Kalkon sebagai Inhibitor untuk Sel Kanker Paru-Paru A549. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 2021, 19 (1). ISSN: 1693-1831, E-ISSN: 2614-6495.
30. Effendy. Teori VSEPR Kepolaran dan Gaya Antarmolekul; Bayumedia Publishing: Malang, Indonesia, 2006.
31. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* 4th Edition; W.H. Freeman Company: New York, 2000.
32. Chairunnisa, A.; Runadi, D. Aktivitas Kalkon Terhadap Reseptor Esterogen B (Er-B) Sebagai Antikanker Payudara Secara In Vitro Dan In Silico. *Farmaka* 2016, 14 (2), 1-8.

33. Qoonita, F.; Daryono, H.T. Hubungan Kuantitatif Struktur Dan Aktivitas Senyawa Turunan 3-Haloasilaminobenzoilurea Sebagai Inhibitor Pembentukan Mikrotubulus. *Acta Pharmaceutica Indonesia* 2012, 27, 76-80.
34. Rachmania, R. A.; Hariyanti H.; Zikriah, R.; Soultan, A. Studi In Silico Senyawa Alkaloid Herba Bakung Putih (*Crinum Asiaticum L.*) pada Penghambatan Enzim Siklooksigenase (COX). *Jurnal Kimia VALENSI* 2018, 4 (2), 124-136.
35. Siswandono. *Kimia medisinal I*, ed kedua; Airlangga University Press: Surabaya, 2016.
36. Guedes, I. A.; Pereira, F. S. S.; Dardenne, L. E. Empirical Scoring Functions for Structure-Based Virtual Screening: Applications, Critical Aspects, and Challenges. *Front. Pharmacol* 2018, 9, 1089. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01089>.
37. Syahputra, G.; Ambarsari, L.; Sumaryada, T. Simulasi Docking Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin Dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12- Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika* 2014, 10(1), 55-67.
38. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 2000, 44(1), 235–249.
39. Daina, A.; Zoete, V. A. BOILED-Egg to Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* 2016, 11(11), 1117–1121.
40. Adriani. Prediksi Senyawa Bioaktif dari Tanaman Sanrego (*Lunasia Amara Blanco*) Sebagai Inhibitor Enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) Melalui Pendekatan Molecular Docking. *Jurnal Ilmiah Pena* 2018, 1 (1), 6-11.
41. Bachtiar; K. R.; Susanti, S.; Mardianingrum, R. Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa dalam Minyak Atsiri Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum Roxb*) Secara In Silico. *Journal of Pharmacopolium* 2021, 4 (1).
42. Pires, D. E.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* 2015, 58 (9), 4066-4072.
43. El-Din, H. M. A.; Loutfy, S. A.; Fathy, N.; Elberry, M. H.; Mayla, M. A.; Kassem, S.; Naqvi, A. Molecular docking based screening of compounds against VP40 from Ebola virus. *Bioinformation* 2016, 12 (3), 192-196.
44. Kesuma, D.; Siswandono; Purwanto, B. T.; Hardjono, S. Uji In silico Aktivitas Sitotoksik dan Toksisitas Senyawa Turunan N-(Benzoil)-N'- feniltiourea Sebagai Calon Obat Antikanker. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* 2018, 3 (1), 01-11. DOI: <https://doi.org/10.20961/jpscr.v3i1.16266>.
45. Hodgson, E.; Levi P. E. *A Textbook of Modern Toxicology*; Mc Graw-Hill Higher Education: Singapore, 2000.
46. Hodge, H.C.; Sterner, J.H. Tabulation of Toxicity Classes. *Journal American Industrial Hygiene Association Quarterly* 1949, 10 (4), Issue 4, 93-96.



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).