

## PENAMBATAN MOLEKUL SENYAWA AKTIF *Spirulina platensis* SEBAGAI INHIBITOR TMPRSS2 UNTUK MENCEGAH INFEKSI SARS-COV-2

Putu Kristiani Kalontong<sup>1</sup>, Mega Safithri<sup>1,3\*</sup>, Kustiariyah Tarman<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University  
Jalan Meranti, Dramaga, Kabupaten Bogor 16680 Jawa Barat. Telepon (0251) 8423267

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University,  
Jalan Agatis, Dramaga, Kabupaten Bogor, 16680 Jawa Barat. Telepon (0251) 8622915

<sup>3</sup>Divisi Bioteknologi Kelautan, Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan, LPPM IPB

Diterima: 10 April 2022/Disetujui: 22 Juli 2022

\*Korespondensi: [safithri@apps.ipb.ac.id](mailto:safithri@apps.ipb.ac.id)

**Cara sitasi (APA Style 7<sup>th</sup>):** Kalontong, P. K., Safithri, M., & Tarman, K. (2022). Penambatan Molekul Senyawa Aktif *Spirulina platensis* sebagai Inhibitor TMPRSS2 untuk Mencegah Infeksi SARS-COV-2. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 253-267. <http://dx.doi.org/>

### Abstrak

*Spirulina platensis* merupakan mikroalga spesies alga hijau biru (*Cyanophyta*) yang dimanfaatkan sebagai makanan kesehatan dan sumber berbagai jenis nutrisi yang dibutuhkan oleh tubuh manusia. Senyawa yang diisolasi dari mikroalga ini telah dilaporkan sebagai penghambat yang manjur terhadap beberapa jenis virus. Penyakit COVID-19 merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus *corona* sindrom pernapasan akut parah 2 (SARS-CoV-2). Secara mekanisme, *spike* protein SARS-CoV-2 diaktivasi oleh protein TMPRSS2 untuk memasuki sel inang. Oleh karena itu, aktivitas TMPRSS2 yang dihambat dapat mencegah infeksi SARS-CoV-2. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi senyawa aktif *S. platensis* sebagai inhibitor TMPRSS2 dalam mencegah infeksi SARS-COV-2 yang diharapkan dapat meminimalisasi keparahan penyakit COVID-19. Indikator yang digunakan adalah aktivitas penambatan molekul berdasarkan energi afinitas ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ). Senyawa aktif yang potensial juga dibandingkan terhadap ligan alami dan nafamostat. Penambatan molekul dilakukan pada 45 senyawa dari 108 senyawa aktif *S. platensis* dengan protein TMPRSS2. Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa quercitrin berpotensi sebagai inhibitor TMPRSS2 karena memiliki  $\Delta G$  paling negatif yaitu -7,40 kkal/mol dengan konstanta inhibisi sebesar 3,77  $\mu M$ . Quercitrin juga dapat berikatan dengan 2 residu sisi aktif TMPRSS2.

Kata kunci: COVID-19, penambatan molekuler, *Spirulina platensis*, SARS-CoV-2, TMPRSS2, quercitrin

## Molecular Docking of Active Compound of *Spirulina platensis* as TMPRSS2 Inhibitor to Prevent the SARS-COV-2 Infection

### Abstract

*Spirulina platensis* is a blue green algae (*Cyanophyta*) species that consumed as a healthy food and as a source of various types of nutritions that needed by the human body. The compounds that isolated from the microalgae has been reported as effective inhibitors against several types of viruses. COVID-19 is a disease that caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In mechanism, spike protein SARS-CoV-2 is activated by TMPRSS2 to enter host cells. Thus, inhibiting TMPRSS2 activity can be prevent the SARS-CoV-2 infection. This study aims to analyze the potential of the active compound of the extracts of *S. platensis* as TMPRSS2 inhibitor to prevent the SARS-CoV-2 infection that expected to reduce the severity of the COVID-19. This study using molecular docking study based on the affinity energy ( $\Delta G$ ) and inhibition constant ( $K_i$ ). The potential active compound also compared to natural ligands and nafamostat. Molecular docking was conducted on 45 of 108 active compounds of *S. platensis* with TMPRSS2

protein. Molecular docking results indicate that quercitrin has the potential as a TMPRSS2 inhibitor due to its most negative  $\Delta G$  by  $-7.40$  kcal/mol and inhibition constant by  $3.77$  M. The quercitrin also can bind to 2 residues from the active side of TMPRSS2 than natural ligands and nafamostat that only bind to 1 residue of the active side of TMPRSS2.

Keyword: bioaccumulation, contaminants, hazard quotient, rainbow trout, risk ranger

## PENDAHULUAN

COVID-19 merupakan penyakit yang disebabkan oleh SARS-CoV-2 yang sekarang menjadi sebuah pandemi terjadi di seluruh dunia termasuk Indonesia. Gejala-gejala COVID-19 paling umum yaitu demam, batuk kering, dan rasa lelah. Namun orang-orang dengan penyakit bawaan (komorbid) memiliki kemungkinan lebih besar mengalami sakit lebih serius (World Health Organization 2020a; World Health Organization 2020b). Transmembran Serine Protease 2 (TMPRSS2) merupakan protein pada permukaan sel inang yang membantu SARS-CoV-2 memasuki sel sebagai langkah awal menginfeksi sel (Hoffmann *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Penghambatan aktivitas TMPRSS2 dapat mencegah SARS-CoV-2 masuk ke dalam sel sehingga dapat mencegah infeksi SARS-CoV-2 pada sel paru-paru (Hoffmann *et al.*, 2020).

Saat ini vaksin merupakan salah satu cara dan solusi dalam mencegah infeksi SARS-CoV-2. Namun, Kementerian Kesehatan RI menyatakan bahwa orang yang divaksin bukan berarti terbebas dari infeksi virus, peluang infeksi masih ada namun gejala yang ditimbulkan tidak seberat orang yang tidak divaksin (KEMENKES RI 2021). Oleh karena itu, pencarian obat herbal maupun modern yang efektif dalam mencegah dan mengobati infeksi virus SARS-CoV-2 masih terus dilakukan. Studi penambatan molekul (*in silico*) dapat dijadikan sebagai langkah awal dalam pencarian kandidat obat sebelum dilakukan studi *in vitro* maupun *in vivo* sehingga dapat menggunakan waktu dan biaya yang efisien. Studi *in silico* merupakan studi komputasi yang dapat digunakan untuk memprediksi interaksi suatu senyawa dengan molekul target.

*Spirulina platensis* merupakan salah satu spesies dari alga hijau biru (*Cyanophyta*) dikenal sebagai suplemen makanan yang memiliki kandungan protein

yang sama dengan daging dan kedelai (Lupatini *et al.*, 2017). Efektivitas ekstrak *Spirulina* dalam mencegah infeksi beberapa jenis virus telah dilaporkan. Penelitian terbaru dilaporkan secara *in vitro*, ekstrak air dingin *S. platensis* mampu menghalangi interaksi spike protein virus pseudotipe berbasis VSV (pvs) dari SARS-CoV-2 dengan reseptornya (Joseph *et al.*, 2020). Penelitian ini bertujuan menguji potensi senyawa aktif *S. platensis* sebagai inhibitor Transmembran Protease Serina 2 (TMPRSS2) sehingga dapat mencegah infeksi SARS-CoV-2.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah struktur 3D reseptor Transmembran Protease Serina 2 (TMPRSS2) dengan PDB:7MEQ, struktur 3D dari 108 ligan berupa senyawa flavonoid dan fenol ekstrak air dan etanol yang diidentifikasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Gabr *et al.*, 2020), senyawa ekstrak metanol dan etil asetat hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (Ozdemir *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011; Elshouny *et al.*, 2021) dan senyawa ekstrak pigmen hasil analisis *Direct Infusion-Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (DIMS-APCI) dan *Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (LC-APCI-FT-ICR MS) (Sommella *et al.*, 2018), dan struktur 3D nafamostat sebagai ligan pembanding.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop Lenovo dengan spesifikasi CPU @ AMD Ryzen 3 3250U 2.6GHz, RAM @ 4GB, penyimpanan @ 256GB SSD dan sistem operasi windows 10 Home SL, perangkat lunak Avogadro, BIOVIA Discovery Studio Visualizer v16.1.0.15350, dan YASARA.

## Metode Penelitian

### Preparasi struktur ligan

Struktur 3D atau 2D (jika tidak tersedia struktur 3D) senyawa aktif *S. platensis* dan senyawa pembanding diunduh dalam format SDF (.sdf) atau MOL (.mol) melalui laman pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Ligan dengan struktur 2D dikonversi ke 3D dengan bantuan aplikasi AVOGADRO dan disimpan dalam format .pdb. selanjutnya struktur 3D tersebut ditambahkan atom hidrogen dan dioptimasi geometri (minimisasi energi) dan disimpan dalam format .pdb. menggunakan aplikasi YASARA.

### Analisis Lipinski's rule dan toksisitas ligan

Sebanyak 108 senyawa aktif *S. platensis* dianalisis *Lipinski's rule* menggunakan situs daring <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/Lipinski.jsp>. Aspek-aspek yang termasuk ke dalam *Lipinski's rule* yaitu massa molekul relatif (BM)  $\leq 500$  Da., jumlah akseptor ikatan hidrogen  $\leq 10$ , jumlah donor ikatan hidrogen  $\leq 5$ ,  $\log P \leq 5$  dan nilai refraktivitas molar berkisar antara 40-130 (Lipinski, 2004). Senyawa uji yang melanggar tidak lebih dari dua aturan lipinski dilanjutkan untuk analisis toksisitas melalui laman [http://lmm.d.ecust.edu.cn/admet\\_sar1/predict/](http://lmm.d.ecust.edu.cn/admet_sar1/predict/) dan [http://lmm.d.ecust.edu.cn/admet\\_sar2/](http://lmm.d.ecust.edu.cn/admet_sar2/). Parameter kontrol analisis toksisitas yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas inhibisi *human ether a go-go related gene* (herG), karsinogenesis, dan toksisitas oral akut.

### Preparasi struktur reseptor

Struktur 3D protein target Tmprss2 diperoleh dari bank data protein ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) dan dilakukan analisis stabilitas reseptor secara daring menggunakan PROCHECK dengan mengakses laman <http://services.mbi.ucla.edu/>. Hasil analisis diperoleh data berupa diagram ramachandran. Selanjutnya Struktur 3D protein reseptor juga dipreparasi menggunakan aplikasi YASARA dengan menghilangkan air, menambahkan atom hidrogen dan memisahkan ligan alami. Kemudian disimpan dalam format .pdb untuk dilakukan validasi metode dan penambatan molekul dengan ligan.

### Validasi metode penambatan molekul

Validasi dilakukan untuk menentukan nilai *Root Mean Standard Deviation* (RMSD) kurang dari 2 Å. Validasi dilakukan dengan menentukan *grid box* yang dibuat di daerah penambatan ligan alami. Modifikasi ukuran *grid box* 1A hingga 7A dengan interval 0,25A dilakukan untuk memperoleh hasil interaksi terbaik (nilai  $\Delta G$  yang paling negatif). *File* reseptor yang telah dipreparasi dan dilengkapi dengan pengaturan *grid box* divalidasi dengan cara menambatkan kembali ligan alami terhadap protein reseptor sebanyak 999 kali *running*.

### Penambatan molekul ligan uji (*Virtual screening*)

Penambatan molekul reseptor Tmprss2 dilakukan di daerah penambatan ligan alami dengan ukuran *grid box* terbaik hasil validasi. Ligan uji yang telah dipreparasi dan digabung diunggah pada program YASARA yang telah berisi *file* reseptor yang sudah dipreparasi dan dilengkapi dengan pengaturan *grid box* terbaik. Sebelum dilakukan penambatan, setiap ligan uji dipisahkan menjadi *object* yang terpisah untuk dapat ditambatkan secara bersamaan. Hasil penambatan molekul didapatkan dokumen *out* yang berisi energi afinitas (*binding energy*) dan konstanta disosiasi (KD) dengan format \*.txt.

### Analisis Hasil Penambatan Molekuler

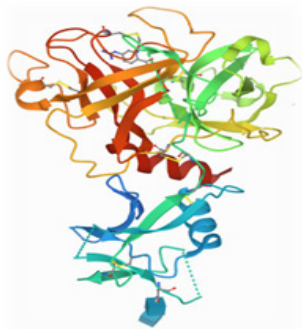
Analisis hasil penambatan molekul dilakukan berdasarkan penelitian Pratama (2015). Data perubahan energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) yang diperoleh dari hasil penambatan digunakan untuk menentukan konstanta inhibisi ligan yang diperoleh dari persamaan  $\Delta G = RT \ln KI$  ( $\Delta G$  = Energi bebas gibbs (kcal/mol),  $R = 1.986$  kal/molK,  $T = 298.15$  K).

Kompleks ligan-reseptor hasil penambatan molekul dalam format yob. dikonversi menjadi pdb. menggunakan program YASARA kemudian divisualisasi menggunakan perangkat lunak Discovery Studio untuk analisis interaksi dan jenis ikatan ligan-reseptor.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Reseptor

Struktur 3D Tmprss2 (PDB 7MEQ) (Gambar 1) yang diperoleh dari bank PDB merupakan hasil kristalisasi menggunakan sinar x difraksi dengan resolusi 1,95 Å (Fraser *et al.*, 2021). Semakin kecil resolusi struktur protein hasil sinar x kristalografi menunjukkan struktur tersebut mendekati struktur yang ada di dalam sel (Aitipamula & Vangala, 2017). Reseptor juga berasal dari spesies *Homo sapiens* agar hasil penambatan yang dilakukan mendekati kondisi yang sebenarnya. Visualisasi protein dilakukan menggunakan perangkat lunak YASARA yang memperlihatkan bahwa struktur Tmprss2 terikat satu ligan yaitu 4-carbamimidamidobenzoic acid. Dalam penelitian ini, ligan yang terikat pada protein dihilangkan, sehingga struktur protein yang digunakan adalah struktur tanpa terikat ligan.



Gambar 1 Struktur 3D Tmprss2 (PDB 7MEQ)

Struktur protein reseptor perlu dianalisis lebih lanjut menggunakan plot Ramachandran untuk mengetahui kualitas struktur protein. Plot Ramachandran merupakan plot yang menggambarkan residu asam amino dari struktur protein/enzim. Setiap residu asam amino memiliki satu sudut phi dan psi sehingga satu protein dapat digambarkan dalam banyak plot tergantung pada jumlah residu asam aminonya. Plot ramacandran terdiri dari empat kuadran dan empat daerah. Empat kuadran yaitu kuadran I, II, III, dan IV dan empat daerah yaitu *most favoured regions*, *additional allowed region*, *generously allowed region*, dan *disallowed regions*.

Kualitas struktur protein dikatakan baik jika residu non-glisin pada *disallow region* (daerah yang tidak diinginkan) lebih kecil dari 15% (Lovell *et al.*, 2003). Hasil analisis berdasarkan plot Ramachandran menunjukkan bahwa struktur protein Tmprss2 memiliki kualitas baik karena residu non-glisin pada *disallow region* kurang dari 15% yaitu 0,7% (Gambar 2) yang menunjukkan bahwa struktur reseptor memiliki stabilitas yang baik untuk dapat digunakan sebagai reseptor dalam penambatan molekuler.

### Karakterisasi Ligan Uji

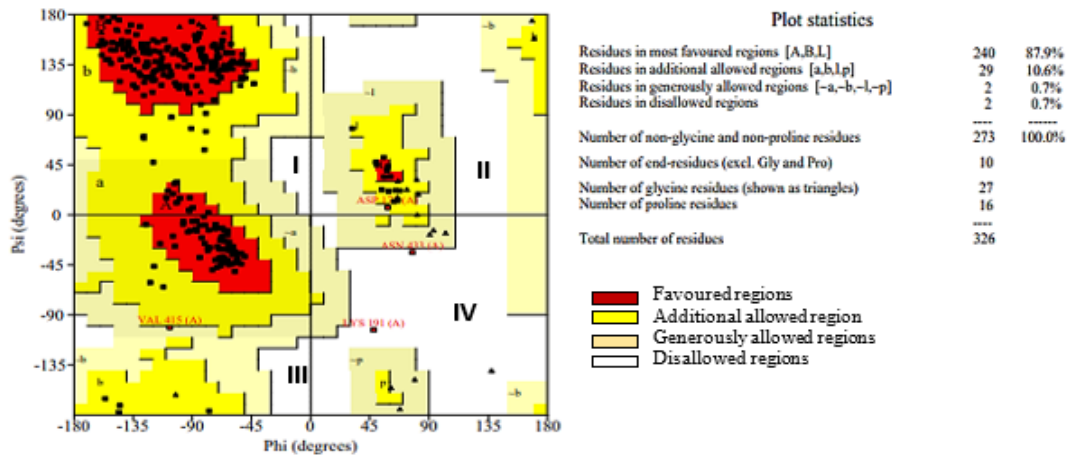
#### Kelarutan ligan (*Lipinski's rule*)

Proses absorpsi dan distribusi obat di tubuh akan dipengaruhi oleh permeabilitas obat tersebut. Suatu obat dikatakan memiliki permeabilitas baik jika memenuhi lima aturan Lipinski sehingga dapat dihantarkan secara efektif melalui oral. Molekul obat yang tidak memenuhi aturan Lipinski tidak disarankan digunakan secara oral namun lebih disarankan untuk injeksi (Lipinski, 2004). Penelitian ini berfokus pada kandidat obat yang nantinya dapat digunakan secara oral, sehingga senyawa yang melanggar lebih dari dua aturan Lipinski tidak dilanjutkan untuk prediksi potensinya secara *insilico*. Hasil prediksi *Lipinski's Rule* dari 108 senyawa aktif *S. platensis* diperoleh 46 senyawa dengan aturan Lipinski yang dilanggar tidak lebih dari 2 (Tabel 1).

#### Toksistas Ligan (ADMET)

Prediksi toksistas ligan dilakukan agar senyawa target yang menjadi kandidat obat dapat bekerja efektif tanpa memberikan dampak negatif bagi tubuh. Tiga parameter yang dianalisis yaitu *human ether a go-go related gene* (herG), karsinogenisitas, dan toksistas oral akut. herG merupakan suatu gen yang berperan dalam mengatur dan pemeliharaan irama jantung (Perrin *et al.*, 2008). Jika kerja gen tersebut terhambat oleh senyawa obat, maka akan menyebabkan aritmia jantung dan risiko kematian mendadak (Roden, 2004; Lamothe *et al.*, 2016). Penghambatan herG menjadi indikator kardiotoksistas suatu obat (Kalyaanamoorthy & Barakat, 2018).





Gambar 2 Plot Ramachandran untuk protein Tmprss2 (PDB: 7MEQ) yang dihasilkan oleh PROCHECK.

Tabel 1 Hasil prediksi *Lipinski's Rule* dari 45 senyawa aktif *S. platensis*

No	Senyawa	Rumus molekul	<i>Lipinski's Rule</i>				
			A	B	C	D	E
1	9,12-Octadecadienoic acid (asam linoleat)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	1	2	86,99	5,88
2	Hexadecanoic acid, metil ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	0	2	82,33	5,64
3	Fitol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	1	1	95,54	6,36
4	Isophytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	1	1	95,56	6,36
5	Alpha-Ionene	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub>	174	0	0	56,21	3,38
6	Apigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270	3	5	70,81	2,42
7	Epikatekin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290	5	6	72,62	1,55
8	Hesperetin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	302	3	6	76,75	2,52
9	Quercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448	7	11	10,86	0,30
10	4-Amino-benzoic	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	137	3	3	37,81	0,97
11	Asam benzoat	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	1	2	33,40	138,00
12	Asam kafeat	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180	3	4	46,44	1,20
13	Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354	6	9	82,52	-0,65
14	Asam sinamat	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	148	1	2	43,11	1,78
15	Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194	2	4	51,33	1,50
16	Asam galat	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170	4	5	38,40	0,50
17	Isoferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194	2	4	51,33	1,50
18	P-coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164	2	3	44,78	1,49
19	P-OH-Asam benzoat	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138	2	3	35,07	1,09
20	Protocatechuic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154	3	4	36,73	0,80
21	Pirogalol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126	3	3	31,44	0,80

Tabel 1 Hasil prediksi *Lipinski's Rule* dari 45 senyawa aktif *S. platensis* (lanjutan)

No	Senyawa	Rumus molekul	<i>Lipinski's Rule</i>				
			A	B	C	D	E
22	<i>Rosmarinic acid</i>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360	5	8	89,80	1,76
23	Asam salisilat	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138	2	3	35,07	1,09
24	<i>Vanillic acid</i>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168	2	4	41,62	1,10
25	<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid</i>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	166	2	4	40,36	1,08
26	<i>6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one</i>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268	0	1	85,40	6,01
27	Fitol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	1	1	95,56	6,36
28	<i>5-Isopropyl-6-methyl-hepta-3,5-dien-2-ol</i>	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	168	1	1	54,03	2,92
29	<i>6,9,12-Octadecatrienoic acid</i>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278	1	2	86,90	5,66
30	<i>9-Octadecenoic acid</i> , metil ester	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296	0	2	91,47	6,20
31	<i>11,13-Dimethyl-12-tetradecen-1-ol acetate</i>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282	0	2	86,78	5,66
32	<i>cis-9-Hexadecenoic acid</i>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254	1	2	77,85	5,33
33	<i>n-Hexadecanoic acid</i>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	1	2	77,95	5,55
34	<i>octanoic acid</i> , 4-metil-, etil ester	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186	0	2	54,56	3,16
35	Asam oksalat, isobutil pentil ester	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	216	0	4	56,28	1,92
36	<i>Pentadecanoic acid</i> , 14-metil-, metil ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	0	2	82,26	5,50
37	<i>Sulfurous acid, 2-Ethylhexyl Isohexyl Ester</i>	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> S	278	0	3	77,56	5,12
38	<i>2-(9-Octadecenyloxy)</i> etanol atau <i>2-octadec-9-enoxyethanol</i>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	1	2	97,36	6,03
39	<i>Tetracosanoic acid</i> , metil ester	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	382	0	2	119,26	8,76
40	<i>Ethyl β-apo-8'-carotenoate</i>	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	460	0	2	148,55	9,09
41	β-Apo-8'-karotenal	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O	416	0	1	137,98	8,72
42	10-Apo-β-karotenal	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O	376	0	1	124,23	7,78
43	α-tokoferol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430	1	2	134,39	8,84
44	δ-tokoferol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	402	1	2	124,92	8,22
45	γ-tokoferol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416	1	2	129,65	8,53
46	Nafamostat (referensi)	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	347	7	7	101,83	2,25

Keterangan: (A) berat molekul (< 500 Da), (B) donor ikatan-H (< 5), (C) akseptor ikatan-H (< 10), (D) *refractivity* molar (< 40-130), (E) Log P (< 5), warna abu-abu: pelanggaran aturan Lipinski.

Pada prediksi penghambatan herG menggunakan perangkat lunak admetSAR1 maupun admetSAR2, nilai yang disajikan yaitu inhibitor, inhibitor lemah, dan non inhibitor dengan peluang yaitu 0-1. Hasil penelitian pada Tabel 2 menyajikan 9 senyawa uji dan nafamostat sebagai ligan pembanding dengan kategori inhibitor lemah dengan nilai peluang untuk nafamostat yaitu 0,94 dan

senyawa uji antara 0,72-0,94, yang artinya ada kemungkinan 94% bahwa nafamostat sebagai ligan pembanding merupakan inhibitor lemah herG dan ada kemungkinan 72% - 94% bahwa 9 senyawa uji tersebut merupakan inhibitor lemah herG berdasarkan prediksi admetSAR1. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi kardiotoksitas yang rendah sehingga masih aman digunakan sebagai

Tabel 2 Hasil prediksi toksisitas oral akut senyawa *S. platensis* menggunakan admetSAR2

No	Rumus molekul	Toksitas					
		<i>Human ether-a-go-go inhibition</i> (herG)		Karsinogenesis		Toksitas oral akut	
		Kategori	Peluang	Kategori	Peluang	Kategori	Peluang
1	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,46	(-)	0,67	IV	0,83
2	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,41	(-)	0,60	III	0,86
3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	(-)	0,43	(-)	0,80	III	0,86
4	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	(-)	0,44	(-)	0,84	III	0,91
5	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub>	(-)	0,43	(-)	0,63	IV	0,65
6	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	(-)	0,90	(-)	1,00	III	0,70
7	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(-)	0,47	(-)	0,93	IV	0,64
8	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(-)	0,73	(-)	0,99	III	0,60
9	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	(-)	0,64	(-)	0,99	III	0,52
10	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	(-)	0,95	(-)	0,75	IV	0,62
11	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,96	(-)	0,68	III	0,81
12	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,90	(-)	0,80	IV	0,56
13	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	(-)	0,54	(-)	0,93	III	0,78
14	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,85	(-)	0,76	III	0,85
15	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,76	(-)	0,80	IV	0,63
16	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	(-)	0,84	(-)	0,66	III	0,69
17	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,76	(-)	0,80	IV	0,63
18	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	(-)	0,88	(-)	0,79	III	0,49
19	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	(-)	0,94	(-)	0,71	III	0,55
20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,90	(-)	0,66	III	0,51
21	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	(-)	0,82	(-)	0,57	III	0,81
22	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	(-)	0,48	(-)	0,86	III	0,77
23	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	(-)	0,91	(-)	0,64	III	0,79
24	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,80	(-)	0,78	III	0,49
25	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,94	(-)	0,68	IV	0,73
26	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	(-)	0,60	(-)	0,76	III	0,77
27	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	(-)	0,43	(-)	0,80	III	0,86
28	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	(-)	0,69	(-)	0,71	III	0,78
29	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,91	(-)	0,67	IV	0,83
30	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,89	(-)	0,57	III	0,64
31	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,39	(-)	0,70	III	0,56

**Tabel 2 Hasil prediksi toksisitas oral akut senyawa *S. platensis* menggunakan admetSAR2 (lanjutan)**

No	Rumus molekul	Toksistas					
		<i>Human ether-a-go-go inhibition</i> (herG)		Karsinogenisitas		Toksistas oral akut	
		Kategori	Peluang	Kategori	Peluang	Kategori	Peluang
32	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,91	(-)	0,67	IV	0,83
33	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,41	(-)	0,60	III	0,86
34	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,46	(-)	0,66	IV	0,64
35	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,55	(-)	0,67	III	0,90
36	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	(-)	0,64	(-)	0,73	IV	0,52
37	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,49	(-)	0,67	III	0,89
38	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> S	(-)	0,68	(-)	0,50	III	0,58
39	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,49	(-)	0,59	III	0,85
40	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	(-)	0,64	(-)	0,60	III	0,86
41	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,94	(-)	0,64	III	0,50
42	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O	WI	0,91	(-)	0,57	III	0,81
43	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O	WI	0,91	(-)	0,57	III	0,81
44	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,72	(-)	0,94	III	0,72
45	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,77	(-)	0,94	III	0,81
46	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,72	(-)	0,94	III	0,72
47	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	WI	0,94	(-)	0,81	III	0,48

Keterangan: 48: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: Nafamostat (referensi); WI: Weak Inhibitor

obat seperti nafamostat yang masih dapat digunakan sebagai inhibitor TMPRSS2 yang disetujui FDA.

Karsinogenisitas merupakan salah satu sifat bahan kimia yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia sehingga studi karsinogenisitas harus dilakukan sebelum aplikasi obat-obatan dan bahan kimia. Senyawa dengan prediksi non-karsinogenik (*inactive*) atau karsinogenik lemah (TD50>10 mg/kg per hari) dianggap sebagai non-karsinogenik dan yang lainnya dianggap sebagai karsinogenik (Li *et al.*, 2015). Hasil prediksi admetSAR2 menunjukkan bahwa nafamostat sebagai ligan pembanding termasuk kategori non-karsinogenik dengan peluang sebesar 0,81 dan 46 senyawa uji termasuk kategori non-karsinogenik dengan peluang 0,50-1,00 (Tabel 2), yang artinya ada kemungkinan 81% bahwa

nafamostat merupakan non-karsinogenik dan ada kemungkinan 50-100% bahwa 46 senyawa uji tersebut merupakan non-karsinogenik.

Toksistas oral akut merupakan suatu keadaan yang menggambarkan efek toksik/racun suatu obat terjadi segera atau dalam waktu singkat setelah pemberian dosis tunggal atau ganda yang diberikan dalam 24 jam secara oral (Walum, 1998). Toksistas oral akut dikategorikan menjadi 4, yaitu kategori I (LD50<50 mg/kg), kategori II (50 mg/kg < LD50 < 500 mg/kg), kategori III (500 mg/kg < LD50 < 5.000 mg/kg) dan kategori IV (5.000 mg/kg < LD50), di mana kategori I dan II dianggap beracun sedangkan kategori III dan IV dianggap tidak beracun (Li *et al.*, 2014). Hasil prediksi toksistas oral akut menggunakan admetSAR2 (Tabel 2) menunjukkan nafamostat termasuk dalam



kategori III, 34 senyawa uji termasuk dalam kategori III dan 12 senyawa uji termasuk dalam kategori IV.

### Validasi Penambatan Molekuler

Validasi metode (*Gridbox*) penambatan molekul dilakukan sebelum simulasi penambatan terhadap senyawa uji dengan melihat *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai RMSD mencerminkan tingkat akurasi sebuah metode penambatan molekul. Metode penambatan molekul dapat dikatakan valid jika nilai RMSD kurang dari 2.00 Å (Verdonk *et al.*, 2005; Trott & Olson, 2010; Dhanik *et al.*, 2013). Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan posisi atom pada ligan semakin baik karena mendekati konformasi asal sehingga *gridbox* tersebut dapat digunakan untuk analisis aktivitas ligan uji terhadap protein target yang sama. Pada penelitian ini validasi metode penambatan molekul reseptor TMPRSS2 dengan ligan alaminya diperoleh ukuran *gridbox* terbaik yaitu 3 Å dengan nilai RMSD < 2 Å yaitu 0,0811 Å dan berikatan hidrogen dengan SER 441 sebagai residu sisi aktif reseptor. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode penambatan molekul reseptor TMPRSS2 dengan ligan alaminya termasuk dalam kategori valid.

### Penambatan Molekuler Ligan Uji

TMPRSS2 merupakan protein transmembran yang secara proteolitik dapat mengaktifkan protein *spike* pada permukaan partikel virus SARS-CoV-2 yang ditambatkan ke reseptor ACE2 untuk mendorong fusi membran virus, selain itu TMPRSS2 juga digunakan oleh coronavirus lain dan virus influenza A untuk aktivasi permukaan glikoprotein, penyebaran, dan patogenesis virus. Secara *in vitro*, dilaporkan bahwa penghambatan TMPRSS2 dapat mencegah infeksi SARS-CoV-2 pada sel paru-paru (Hoffmann *et al.*, 2020; Fraser *et al.*, 2021).

Penambatan molekul dilakukan antara ligan dan reseptor yang kemudian hasilnya dibandingkan dengan ligan pembanding. Pada penelitian ini nafamostat dipilih sebagai ligan pembanding. Nafamostat adalah turunan guanidinobenzoat sintesis yang menghambat berbagai protease serina,

termasuk TMPRSS2. Penggunaan nafamostat telah disetujui FDA sebagai antikoagulan dan pengobatan pankreatitis yang secara efektif dapat mengurangi infeksi SARS-CoV-2 dalam kultur sel paru-paru manusia (Han *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2020). Secara *in vitro* juga dilaporkan bahwa nafamostat lebih mudah membentuk kompleks enzim-substrat yang stabil dengan TMPRSS2 dibanding camostat (Shrimp *et al.*, 2020; Hempel *et al.*, 2021).

Hasil penambatan molekul menghasilkan nilai energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) yang menunjukkan suatu reaksi berjalan pada temperatur dan tekanan konstan dan merupakan parameter kestabilan konformasi antara ligan dengan reseptor (Nelson *et al.*, 2008). Menurut Greaves & Schlecht (1992), nilai energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) merupakan prediktor spontanitas suatu reaksi, ketika  $\Delta G$  bernilai negatif maka suatu reaksi terjadi secara spontan dan ketika  $\Delta G$  bernilai positif maka reaksi terjadi tidak spontan. Dwitiyanti *et al.*, (2019) melaporkan bahwa  $\Delta G$  yang dihasilkan ketika kompleks ligan-reseptor terbentuk dapat menunjukkan afinitas ligan terhadap reseptornya. Jika Nilai  $\Delta G$  rendah, afinitas ligan terhadap reseptor tinggi, namun jika nilai  $\Delta G$  tinggi, afinitas ligan terhadap reseptor rendah. Oleh karena itu, nilai  $\Delta G$  yang paling rendah digunakan untuk pemilihan ligan terbaik hasil penambatan molekul. Selain analisis  $\Delta G$ , analisis konstanta inhibisi ( $K_i$ ) juga dilakukan untuk mengetahui daya hambat suatu senyawa terhadap reseptornya, di mana semakin kecil nilai  $K_i$  maka semakin kuat hambatan senyawa tersebut (Umamaheswari *et al.*, 2013). Sehingga semakin kecil nilai  $\Delta G$  yang dihasilkan dari penambatan molekul maka nilai  $K_i$  juga akan semakin kecil. Kedua nilai ini dapat menjadi dua tolok ukur dalam menentukan senyawa terbaik.

Penambatan molekul dilakukan pada 46 senyawa aktif spirulina yang telah melewati uji Lipinski dan toksisitas dengan reseptor TMPRSS2. 45 senyawa aktif dapat dilakukan penambatan dengan ukuran *gridbox* yang dibuat sedangkan 1 senyawa yaitu Ethyl  $\beta$ -apo-8'-carotenoate tidak dapat ditambatkan karena ukuran molekul yang besar. Tabel 3 memperlihatkan bahwa 43 senyawa memiliki

Tabel 3 45 senyawa aktif *S. platensis* (ligan) diperoleh dengan skrining *docking* molekuler dengan protein TMPRSS2 (reseptor)

No	Ligan	Formula	$\Delta G$ (kkal/mol)	KI ( $\mu M$ )
	Nafamostat (referensi)	$C_{19}H_{17}N_5O_2$	-7,73	2,15
	Ligan Alami (kontrol)	$C_8H_9N_3O_2$	-6,04	36,96
1	9,12-Octadecadienoic acid (asam linoleat)	$C_{18}H_{32}O_2$	-4,27	734,44
2	Hexadecanoic acid, metil ester	$C_{17}H_{34}O_2$	-4,29	713,65
3	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	-4,37	622,41
4	Isofitol	$C_{20}H_{40}O$	-4,70	360,11
5	<i>alpha</i> -Ionene	$C_{13}H_{18}$	-5,19	155,56
6	Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	-6,75	11,14
7	Epikatekin	$C_{15}H_{14}O_6$	-6,99	7,53
8	Hesperetin	$C_{16}H_{14}O_6$	-6,93	8,24
9	Quercitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	-7,40	3,77
10	4-Amino-benzoat	$C_7H_7NO_2$	-5,51	90,62
11	Asam benzoat	$C_7H_6O_2$	-5,08	188,59
12	Asam kafeat	$C_9H_8O_4$	-5,96	42,88
13	Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	-4,49	513,41
14	Asam sinamat	$C_9H_8O_2$	-5,50	92,00
15	Ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	-5,86	50,26
16	Asam galat	$C_7H_6O_5$	-5,86	50,26
17	Isoferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	-5,86	50,26
18	<i>P</i> -coumaric acid	$C_9H_8O_3$	-5,48	95,65
19	<i>P</i> -OH-Asam benzoat	$C_7H_6O_3$	-5,37	115,56
20	Protocatechuic acid	$C_7H_6O_4$	-5,93	44,43
21	Pirogalol	$C_6H_6O_3$	-5,09	186,38
22	Rosmarinic acid	$C_{18}H_{16}O_8$	-7,20	5,23
23	Asam salisilat	$C_7H_6O_3$	-5,72	64,21
24	Vanillic acid	$C_8H_8O_4$	-5,86	50,52
25	1,2-Benzenedicarboxylic acid	$C_8H_6O_4$	-5,86	50,52
26	6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one	$C_{18}H_{36}O$	-4,39	603,77
27	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	-4,90	254,30
28	5-Isopropil-6-metil-hepta-3,5-dien-2-ol	$C_{11}H_{20}O$	-4,63	403,94
29	6,9,12-Octadecatrienoic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	-4,62	410,12
30	9-Octadecenoic acid, metil ester	$C_{19}H_{36}O_2$	-4,62	410,12
31	11,13-Dimethyl-12-tetradecen-1-ol acetate	$C_{18}H_{34}O_2$	-4,34	653,65

Tabel 3 45 senyawa aktif *S. platensis* (ligan) diperoleh dengan skrining *docking* molekuler dengan protein TMPRSS2 (reseptor) (lanjutan)

No	Ligan	Formula	$\Delta G$ (kkal/mol)	KI ( $\mu M$ )
32	<i>cis-9-Hexadecenoic acid</i>	$C_{16}H_{30}O_2$	-4,23	785,77
33	<i>Hexadecanoic acid</i> , metil ester	$C_{17}H_{34}O_2$	-4,23	785,77
34	<i>n-Hexadecanoic acid</i> atau asam palmitat	$C_{16}H_{32}O_2$	-4,23	785,77
35	<i>Octanoic acid</i> , 4-metil-, etil ester	$C_{11}H_{22}O_2$	-4,24	776,53
36	Asam oksalat, isobutil pentil ester	$C_{11}H_{20}O_4$	-4,81	297,05
37	<i>Pentadecanoic acid</i> , 14-metil-, metil ester	$C_{17}H_{34}O_2$	-4,40	588,67
38	<i>Sulfurous acid</i> , 2-ethylhexyl isohexyl ester	$C_{14}H_{30}O_3S$	-4,51	491,35
39	2-(9-Octadecenyloxy) ethanol	$C_{20}H_{40}O_2$	-4,15	904,00
40	<i>Tetracosanoic acid</i> , metil ester	$C_{25}H_{50}O_2$	-3,93	1.315,21
41	$\beta$ -Apo-8'-karotenal	$C_{30}H_{40}O$	(-)	(-)
42	10-Apo- $\beta$ -karotenal	$C_{27}H_{36}O$	(-)	(-)
43	$\alpha$ -tokoferol	$C_{29}H_{50}O_2$	-4,77	318,34
44	$\delta$ -tokoferol	$C_{27}H_{46}O_2$	-4,97	227,48
45	$\gamma$ -tokoferol $C_{28}H_{48}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	-4,59	430,71

interaksi dengan reseptor TMPRSS2 dengan energi bebas ( $\Delta G$ ) yang bervariasi, sedangkan dua senyawa yaitu  $\beta$ -Apo-8'-karotenal dan 10-Apo- $\beta$ -karotenal tidak memiliki interaksi dengan TMPRSS2.

Hasil uji *in silico* pada Tabel 4 memperlihatkan lima senyawa dengan nilai  $\Delta G$  paling negatif terhadap reseptor TMPRSS2. Quercitrin menunjukkan nilai  $\Delta G$  (-7,40 kkal/mol) mendekati  $\Delta G$  nafamostat yaitu -7,73 kkal/mol, lebih negatif dari ligan alami yaitu -6,04 kkal/mol dan paling negatif dari senyawa uji lainnya, yang artinya stabilitas konformasi kompleks quercitrin-TMPRSS2 mendekati nafamostat dan lebih baik dari kompleks ligan alami dan senyawa uji lainnya. Karena nilai  $\Delta G$  dan  $K_i$  berbanding lurus, maka daya hambat quercitrin juga mendekati nafamostat. Hal ini sesuai perhitungan diperoleh nilai  $K_i$  quercitrin sebesar 3,77  $\mu M$  (Tabel 4). Selain melihat nilai  $\Delta G$  dan  $K_i$ , penilaian ikatan ligan dengan reseptor serta residu sisi aktif reseptor juga diperlukan sebagai acuan dalam penentuan ligan terbaik.

Telah dilaporkan residu yang berperan sebagai sisi aktif pada protein TMPRSS2 yaitu

Asp 345, Ser 441 dan His 296 (Fraser *et al.*, 2021; Hempel *et al.*, 2021). Hasil uji menunjukkan nafamostat sebagai ligan pembanding berikatan hidrogen dengan residu Ser 441 dan 4-carbamimidamidobenzoic acid sebagai ligan alami berikatan hidrofobik His 296 pada sisi aktif TMPRSS2. Secara *in vitro* juga dilaporkan bahwa nafamostat menetralkan aktifitas TMPRSS2 dengan mengikat residu Ser 441 pada sisi aktif reseptor (Fraser *et al.*, 2021) Hasil uji menunjukkan quercitrin mampu berikatan dengan 2 residu sisi aktif reseptor yaitu berikatan hidrogen dengan Ser 441 dan hidrofobik dengan His 296, sedangkan apigenin dan epikatekin hanya berikatan hidrogen dengan Ser 441, hesperetin berikatan hidrofobik dengan His 296, dan rosmarinic acid tidak ada ikatan dengan residu sisi aktif reseptor TMPRSS2.

Gambar 3 menyajikan superimposisi dari ligan alami-nafamostat, ligan alami-quercitrin yang berikatan dengan sisi aktif dari TMPRSS2. Superposisi ini dibuat sebagai konfirmasi bahwa ligan yang ditambahkan dapat berperan sebagai inhibitor potensial yang dapat mengikat residu asam amino sisi aktif pada protein TMPRSS2.

Tabel 4 5 Senyawa teratas dengan  $\Delta G$  negatif terbanyak

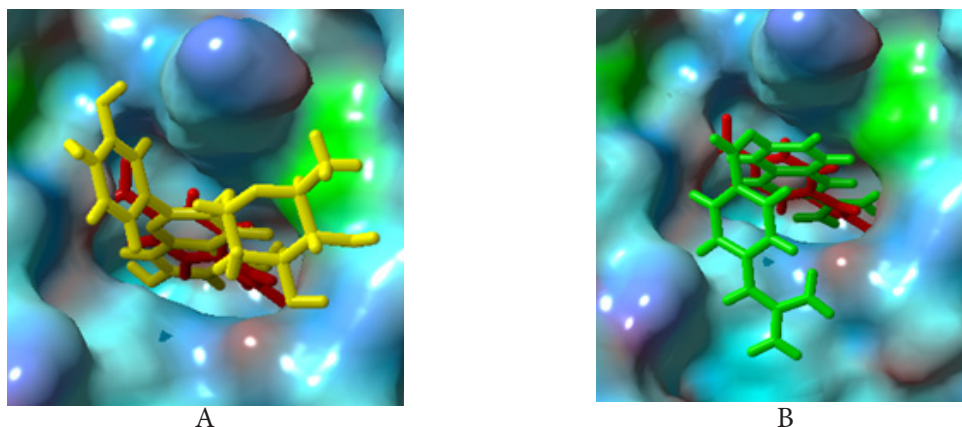
No	Ligan	KI ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	Residu asam amino yang berinteraksi	
				Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
1	<i>Quercitrin</i>	3,77	-7,40	GLY 439	<b>HIS 296</b>
				<b>SER 441</b>	
				GLY 464	
				VAL 473	
2	<i>Rosmarinic acid</i>	5,23	-7.20	SER 436	
				SER 463	
3	Apigenin	11,14	-6.75		CYS 437
				<b>SER 441</b>	GLN 438
				TRP 461	SER 460
					TRP 461
4	Epikatekin	7,53	-6.99	<b>SER 441</b>	
				TRP 461	
				GLY 464	
				VAL 280	
5	Hesperetin	8,24	-6.93	ASP 435	<b>HIS 296</b>
				GLN 438	CYS 465
				PRO 471	
6	Nafamostat (referensi)	2,15	-7.73	ASP 435	CYS 437
				GLY 462	TRP 461
				GLY 464	CYS 465
7	Ligan alami (kontrol)	36,96	-6.04	ASP 435	<b>HIS 296</b>
				<b>SER 441</b>	
				GLY 464	

Berdasarkan hasil skrining senyawa bioaktif secara *in silico*, *quercitrin* diprediksi menjadi kandidat senyawa terbaik sebagai inhibitor protein TMPRSS2. Meskipun nilai  $\Delta G$  kompleks *quercitrin*-TMPRSS2 kurang negatif dibanding kompleks nafamostat-TMPRSS2 sebagai ligan pembanding, namun kompleks *quercitrin*-TMPRSS2 mampu berikatan dengan 2 residu asam amino sisi aktif reseptor sebagai ikatan hidrogen dan hidrofobik sedangkan kompleks nafamostat-TMPRSS2 hanya dapat berikan hidrofobik

dan ligan alami hanya berikatan hidrogen pada 1 residu asam amino sisi aktif reseptor TMPRSS2.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penambatan molekuler 45 senyawa aktif *Spirulina* hasil prediksi *Lipinski's Rule* dan toksisitas dengan protein reseptor TMPRSS2 diperoleh 43 senyawa uji memiliki aktivitas penghambatan terhadap protein reseptor TMPRSS2 kecuali  $\beta$ -Apo-8'-karotenal dan 10-Apo- $\beta$ -karotenal. *Quercitrin*



Gambar 3 Superimposisi ligan; (A) ligan alami (merah) - *quercitrin* (kuning), (B) ligan alami (merah) - *nafamostat* (Hijau), ditampilkan dalam mode tongkat di sisi aktif reseptor TMPRSS2

menunjukkan aktivitas penghambatan terbaik dari ligan alami dan semua senyawa uji yang ditunjukkan dengan nilai energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) sebesar  $-7,40$  kkal/mol, konstanta inhibisi sebesar  $3,77$   $\mu\text{M}$ , dan mampu berikatan dengan 2 residu asam amino sisi aktif reseptor TMPRSS2.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Aitipamula, S., & Vangala, V. R. (2017). X-ray crystallography and its role in understanding the physicochemical properties of pharmaceutical cocrystals. *Journal of the Indian Institute of Science*, 97(2), 227–243.
- Dhanik, A., McMurray, J. S., & Kavraki L. E. (2013). DINC: a new AutoDock-based protocol for docking large ligands. *BMC structural biology*, 13(1), 1–14.
- Elshouny, W. A. E-F, El-Sheekh, M. M., Sabae, S. Z., Khalil, M. A., & Badr, H. M. (2021). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* against aquatic bacterial isolates. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 2021, 1203–1208.
- Fraser, B. J., Beldar, S., Seitova, A., Hutchinson, A., Mannar, D., Li, Y., Kwon, D., Tan, R., Wilson, R. P., & Leopold, K. (2021). Structure, activity and inhibition of human TMPRSS2, a protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *BioRxiv*.
- Gabr, G. A., El-Sayed, S. M., & Hikal, M. S. (2020). Antioxidant activities of phycocyanin: A bioactive compound from *Spirulina platensis*. *J. Pharm. Res. Int*, 32, 73–85.
- Han, S. J., Kim, H. S., Kim, K. I., Whang, S. M., Hong, K. S., Lee, W. K., & Lee, S. H. (2011). Use of nafamostat mesilate as an anticoagulant during extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Korean Medical Science*, 26(7), 945–950.
- Hempel, T., Raich, L., Olsson, S., Azouz, N. P., Klingler, A. M., Hoffmann, M., Pöhlmann, S., Rothenberg, M. E., & Noé, F. (2021). Molecular mechanism of inhibiting the SARS-CoV-2 cell entry facilitator TMPRSS2 with camostat and nafamostat. *Chemical Science*, 12(3), 983–992.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N-H., & Nitsche, A. (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.
- Joseph, J., Ajay, A., Das, V., & Raj, V. S. (2020). Green tea and *Spirulina* extracts inhibit SARS, MERS, and SARS-2 spike pseudotyped virus entry in vitro. *bioRxiv*, 2020.06.20.162701. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.20.162701>
- Kalyanamoorthy, S., & Barakat, K. H. (2018). Development of safe drugs: the hERG challenge. *Medicinal research reviews*, 38(2), 525–555.



- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2021). BUKU SAKU VAKSINASI COVID-19. EDISI PERTAMA (MEI 2021).
- Ko, M., Jeon, S., Ryu, W-S., & Kim, S. (2020). Comparative analysis of antiviral efficacy of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 in human lung cells: Nafamostat is the most potent antiviral drug candidate. *J Med Virol.* 2021 Mar;93(3),1403-1408. doi: 10.1002/jmv.26397. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32767684; PMCID: PMC7436731.
- Kumar, V., Bhatnagar, A., & Srivastava, J. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5(32), 7043–7048.
- Lamothe, S. M., Guo, J., Li, W., Yang, T., & Zhang, S. (2016). The human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel represents an unusual target for protease-mediated damage. *Journal of Biological Chemistry,* 291(39), 20387–20401.
- Li, X., Chen, L., Cheng, F., Wu, Z., Bian, H., Xu, C., Li, W., Liu, G., Shen, X., & Tang, Y. (2014). In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. *Journal of chemical information and modeling,* 54(4), 1061–1069.
- Li, X., Du, Z., Wang, J., Wu, Z., Li, W., Liu, G., Shen, X., & Tang, Y. (2015). In silico estimation of chemical carcinogenicity with binary and ternary classification methods. *Molecular Informatics,* 34(4), 228–235.
- Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug discovery today: Technologies,* 1(4), 337–341.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, III W. B., De Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Ca geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and  $C\beta$  deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,* 50(3), 437–450.
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 97(3), 724–732.
- Ozdemir, G., Ulku, K. N., Dalay, M. C., & Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives,* 18(9), 754–757.
- Perrin, M. J., Subbiah, R. N., Vandenberg, J. I., & Hill, A. P. (2008). Human ether-a-go-go related gene (hERG) K<sup>+</sup> channels: function and dysfunction. *Progress in biophysics and molecular biology,* 98(2–3), 137–148.
- Roden, D. M. (2004). Drug-induced prolongation of the QT interval. *New England Journal of Medicine,* 350(10), 1013–1022.
- Shrimp, J. H., Kales, S. C., Sanderson, P. E., Simeonov, A., Shen, M., & Hall, M. D. (2020). An enzymatic Tmprss2 assay for assessment of clinical candidates and discovery of inhibitors as potential treatment of COVID-19. *ACS pharmacology & translational science,* 3(5), 997–1007.
- Sommella, E., Conte, G. M., Salviati, E., Pepe, G., Bertamino, A., Ostacolo, C., Sansone, F., Prete, F. D., Aquino, R. P., & Campiglia, P. (2018). Fast profiling of natural pigments in different spirulina (*Arthrospira platensis*) dietary supplements by DI-FT-ICR and evaluation of their antioxidant potential by pre-column DPPH-UHPLC assay. *Molecules,* 23(5), 1152.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry,* 31(2), 455–461.
- Umamaheswari, M., Madeswaran, A., & Asokkumar, K. (2013). Virtual screening analysis and in-vitro xanthine oxidase inhibitory activity of some commercially available flavonoids. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR,* 12(3), 317.

- Verdonk, M. L., Chessari, G., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D., & Taylor, R. (2005). Modeling water molecules in protein–ligand docking using GOLD. *Journal of medicinal chemistry*, 48(20), 6504–6515.
- Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. *Environmental health perspectives*. 106(suppl 2), 497–503.
- World Health Organization. 2020a. Tatalaksana klinis infeksi saluran pernapasan akut berat (SARI) suspek penyakit COVID-19, 4:1–25.
- World Health Organization. 2020b. Novel Coronavirus (2019-nCoV).
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., & Li, X. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5),766–788.

#### FIGURE AND TABLE TITLES

*Figure 1* 3D structure of TMPRSS2 (PDB: 7MEQ)

*Figure 2* Ramachandran plot for TMPRSS2 (PDB: 7MEQ) protein generated by PROCHECK.

*Figure 3* Superimposition of ligand. (A) natural ligand (red) - quercitrin (yellow), (B) natural ligand (red) - nafamostat (Green), displayed in stick mode in active side of receptor TMPRSS2

*Table 1* Lipinski's Rule prediction of 45 active compounds of *S. platensis*

*Table 2* ADMET prediction of 45 active compounds of *S. platensis*

*Table 3* 45 active compounds of *S. platensis* (ligan) obtained by molecular docking screening with TMPRSS2 protein (receptor)

*Table 4* Top 5 compounds with most negative  $\Delta G$