

Penapisan Senyawa Kandidat Obat Covid-19 dari Ekstrak Asparagus dengan Mekanisme Inhibisi Spike Protein Varian B.1.1.7 terhadap Ligan

Hanum Sekar Panglipur^{1*}, Fachrurrazie¹, Armi Wulanawati², Joko Untung¹, Anom Cahyotomo¹, Ardina Purnama Tirta¹, Imas Solihat³, Annissa Amalia¹

¹)Program Studi Analisis Kimia, Politeknik AKA Bogor, Bogor, 16154 Indonesia

²)Program Studi Kimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680, Indonesia

³)Program Studi Nanoteknologi Pangan, Politeknik AKA Bogor, Bogor, 16154 Indonesia

*E-mail: hanum@kemenperin.go.id

(Received: 28 Oktober 2023; Accepted: 28 Desember 2023; Published: 30 Desember 2023)

Abstrak

Penyebaran yang cepat dan terus meluas semenjak ditemukannya virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* atau SARS-CoV-2 pada 2019, telah memberikan dampak yang luas pada aspek kesehatan dan kesejahteraan global, khususnya Indonesia. Pencarian terapi standar melalui jalur paru seperti nebulizer, menggunakan ekstrak Asparagus diharapkan mampu menjadi alternatif dan terobosan bagi pengobatan SARS-CoV-2. Pengobatan ini merujuk pada proses penapisan antara *Spike Glyco Protein* (SGP) virus SARS-CoV-2 dengan varian B.1.1.7 dengan reseptor sel manusia ACE2. Penapisan dilakukan dengan mereaksikan senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak Asparagus dengan SGP virus SARS-CoV-2, sehingga infeksi dapat dicegah. Asparagus dipilih karena mengandung banyak senyawa fitokimia yang diharapkan dapat memberikan karakteristik antivirus, dan dapat menjadi acuan pengobatan COVID-19 melalui studi *in silico*. Didapat bahwa Dioscin merupakan senyawa yang paling kuat berinteraksi dengan SGP virus SARS-CoV-2 dengan varian B.1.1.7 dari 67 senyawa ekstrak Asparagus yang dipelajari. Selain Dioscin terdapat 3 senyawa lainnya yang dapat menjadi acuan untuk pengobatan COVID-19, yakni Shatavarin IV, Aspafilioside A, dan Solasonin dengan nilai afinitas masing-masing -8.3, -8.1, -7.9, dan -7.9 kkal/mol.

Kata kunci: asparagus, dioscin, insilico, sars-cov-2, shatavarin IV

Abstract

A rapid & massive infection have happened since Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 or The SARS-CoV-2 virus was found in 2019. The search for therapeutic standard through the pulmonary route such as a nebulizer, using Asparagus extract is expected to be an alternative and breakthrough for the treatment of SARS-CoV-2. This treatment refers to the blocking process between the Spike Glyco Protein (SGP) virus SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 with the human cell receptor ACE2. Blocking is done by reacting the compounds contained in the Asparagus extract with the SARS-CoV-2 virus SGP, thus infection can be prevented. Asparagus was chosen because it contains many phytochemical compounds expected to provide antiviral characteristics and can be used as a reference for treating COVID-19 through in silico studies. Dioscin showed as the most strongly interacting compound with SGP SARS-CoV-2 virus variant B.1.1.7 of the 67 compounds in the Asparagus extract studied. Besides Dioscin, 3 other compounds can be used as references for the treatment of COVID-19, namely Shatavarin IV, Aspafilioside A, and Solasonin with affinity values of -8.3, -8.1, -7.9, and -7.9 kcal/mol, respectively.

Keywords: asparagus, dioscin, insilico, sars-cov-2, shatavarin IV

PENDAHULUAN

Penyebaran yang cepat dan terus meluas semenjak ditemukannya virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* atau SARS-CoV-2 pada 2019, telah memberikan dampak yang luas pada aspek kesehatan dan kesejahteraan global [Lu et al, 2020]. Di Indonesia sendiri, pada awal

Mei 2022 terdapat 6,048,685 kasus terkonfirmasi positif dimana sebanyak 156,396 menyebabkan pasien meninggal dunia [Peta Sebaran | Covid19.go.id]. Pada tahun 2023 melalui Keputusan Presiden Republik Indonesia (Keppres) Nomor 17 Tahun 2023, status Pandemi COVID-19 di Indonesia resmi berakhir. Namun di lapangan

terjadi peningkatan kasus terdapat 6,641,275 kasus terkonfirmasi positif dimana sebanyak 161,870 menyebabkan pasien meninggal dunia pada akhir Desember 2023. Penyebaran yang terus berkembang ini mendorong pemerintah Indonesia melakukan berbagai upaya penanganan Kesehatan dan pemulihan ekonomi [Covid19.go.id].

Jika dibandingkan pada saat awal ditemukan, setidaknya terdapat penambahan 20 variasi nukleotida pada sekuens genomik SARS-CoV-2 [Faria et al, 2021]. Banyaknya penambahan variasi baru SARS-CoV-2 umumnya, diamati pada mutasi Receptor Binding Domain (RBD) atau Receptor Binding Protein dari *Spike Glyco Protein* (SGP), yang berperan dalam memfasilitasi masuknya virus melalui *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (ACE2) yang terdapat pada permukaan sel manusia [Burki, 2021 & Shang et al, 2020]. Salah satu contoh dari pesatnya mutasi SARS-CoV-2 adalah varian B.1.1.7 atau varian alfa yang ditemukan pada awal bulan Desember 2020 [Kupferschmidt, 2020].

Varian B.1.1.7 cukup mendapat perhatian lebih karena mutasi turunannya memiliki penularan yang cepat pada manusia [Ye et al, 2022]. WHO telah menemukan beberapa terapi standar penanganan SARS-CoV-2 menggunakan beberapa kombinasi obat, vaksin, dan lain sebagainya [Ramírez-Salinas et al, 2020 & Villoutreix, 2021]. Proses pengikatan antara SGP SARS-CoV-2 dan ACE2 pada sel manusia menjadi hal yang penting dalam penentuan terapi pengobatan SARS-CoV-2. Hal ini dikarenakan pemblokiran ikatan antara SGP SARS-CoV-2 dan ACE2 dapat menghentikan infeksi lebih lanjut pada sel manusia [Rolta et al, 2021]. Pada vaksin, umumnya antibodi berikatan dengan SGP SARS-CoV-2 dan mencegah virus berikatan dengan ACE2 dan menghalangi patogenesis, namun keamanan dan efektifitas vaksin SARS-CoV-2 bagi penderita auto imun masih perlu dilakukan uji klinis lanjutan [Rolta et al, 2021; He et al, 2006; & Medeiros-Ribeiro et al, 2021]. Beberapa obat sempat mendapatkan Izin Penggunaan Darurat untuk pengobatan SARS-CoV-2, antara lain Ivermectin yang telah digunakan di berbagai negara sebagai pilihan pengobatan lini pertama SARS-CoV-2, dimana Ivermectin melakukan penapisan dengan cara berikatan baik dengan SGP SARS-CoV-2 maupun ACE2 [Zaidi et al, 2022]. Namun, berdasarkan Pedoman Tatalaksana Covid-19 2022, Ivermectin termasuk salah satu obat yang ditarik dari daftar alternatif terapi dan pengobatan SARS-CoV-2 di Indonesia, karena efektifitas yang masih perlu dipelajari dan keamanan konsumsi dalam jumlah besar yang membahayakan [Tata Laksana Covid-19 Edisi 4 & FDA].

Pencarian terapi standar bagi pengobatan SARS-CoV-2 terus dilakukan agar obat maupun

senyawa dapat langsung berinteraksi dengan virus SARS-CoV-2. Pemberian obat maupun senyawa melalui paru menjadi langkah yang menjanjikan dalam pengobatan COVID-19, salah satunya melalui nebulizer [Kaufman, 2022]. Beberapa studi pemberian obat melalui nebulizer sebelumnya telah dilakukan [Lokugamage et al, 2021; Khairnar et al, 2022; & Alton et al, 2015]. Pemberian obat melalui nebulizer memiliki beberapa keunggulan antara lain, mudah digunakan dengan tidal breathing, cocok untuk pasien anak-anak dan orang tua, dapat disesuaikan dengan kondisi keparahan pasien, dan semprotan visible yang dapat memberikan rasa yakin pada pasien [Khairnar et al, 2022]. Melalui jalur paru, diharapkan pemberian obat atau senyawa dapat langsung berinteraksi langsung dengan SGP SARS-CoV-2 dan mencegah virus memasuki sel manusia.

Namun, pencarian obat atau senyawa yang sesuai dan dapat berinteraksi dengan SGP SARS-CoV-2 masih terus dilakukan. Pencarian senyawa yang tepat bagi pengobatan SARS-CoV-2 dilakukan secara *in silico* dengan mencoba mencari molekul maupun ekstrak bahan alam atau tanaman obat yang dapat digunakan dalam proses penapisan SGP SARS-CoV-2 dengan ACE2 [Rolta et al, 2021]. Beberapa ekstrak tanaman obat diketahui memberikan efek antimikroba dan antivirus serta memiliki efek samping yang lebih rendah [Esquenazi et al, 2002 & Jassim et al, 2003]. Salah satu ekstrak tanaman yang akan dipelajari interaksinya terhadap SGP SARS-CoV-2 adalah Asparagus secara *in silico*. Asparagus sp. diketahui memiliki potensi yang tinggi sebagai antimikroba, antiparasitik, antiageing, antidepresan, anti-inflamatori, antioksidan, antifungal, dan antiproliferatif pada sel ganas yang umum ditemui pada sel kanker [Mohammed et al, 2021 & Zhang et al, 2018]. Spesies Asparagus yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Hal ini didukung dengan ditemukannya 94 senyawa fitokimia dalam ekstrak Asparagus antara lain, asam organik, asam amino, peptida dan turunannya, polifenol (asam hidroksisinat, flavonol, lignans and nonlignan), oxylipin, dll [Jiménez-Sánchez et al, 2016]. Studi *in silico* telah menemukan 14 senyawa fitokimia yang dapat berinteraksi dengan SPG pada virus [Chikhale et al, 2020], yang juga diharapkan dapat bersifat antiviral dengan cara berinteraksi dengan SGP SARS-CoV-2.

Studi penapisan SGP SARS-CoV-2 menggunakan ekstrak Asparagus secara *in silico* melalui penambatan molekuler, diharapkan mampu menghemat waktu dan biaya dalam mendesain senyawa yang tepat bagi pengobatan COVID-19. Hal ini dikarenakan interaksi molekuler dari senyawa ekstrak Asparagus yang didapat dari metode penambatan molekuler

(docking), dapat digunakan sebagai acuan dalam memilih senyawa yang tepat dan berpotensi menapis SGP SARS-CoV-2 dengan ACE2 melalui interaksinya dengan SGP virus. Metode penambatan molekuler (*molecular docking*) sendiri umumnya memprediksi ikatan nonkovalen antara molekul protein dengan ligan, dimana tujuan utamanya untuk memprediksi konformasi ikatan berupa posisi dan jenis ikatan serta afinitas ikatan berdasarkan energi ikatan [Trott et al, 2012]. melalui metode ini diharapkan mampu memberikan acuan untuk mensintesis atau mengekstrak senyawa dalam Asparagus yang sesuai untuk pengobatan COVID-19.

Tabel 1. Spesies Asparagus yang digunakan dalam pencarian ligan sebagai kandidat senyawa obat

No	Spesies Asparagus	Bagian Tumbuhan	Dareah Pengambilan Spesies
1	<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Batang	Castera, Italia
2	<i>Asparagus Filicinus</i>	Konsentrat Ungu & Putih	Yunnan China
3	<i>Asparagus Officinalis</i> (liliaceae)	Tunas	Amerika
4	<i>Asparagus Officinalis</i> L.	Rimpang	Jepang
5	<i>Asparagus officinalis</i> L.	Seluruh bagian	China
6	<i>Asparagus officinalis</i>		Spanyol
7	<i>Asparagus racemosus</i>	Seluruh bagian	Australia
8	<i>Asparagus racemosus</i>	Akar	India
9	<i>Asparagus racemosus</i>	Seluruh Bagian Akar	India

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Dalam studi ini digunakan perangkat komputer dengan spesifikasi prosesor tipe Intel® Core i7 4770K, 8M Cache, up to 3.90 GHz RAM 16 GB, SSD SATAIII 500GB, kartu grafis NVIDIA GTX 980 4 GB VRAM, perangkat lunak

ACD Chem Sketch 12.1 (*Advanced Chemistry Development*, Toronto, CA, USA), Marvin Sketch (ChemAxon, Boston, MA, USA), AutoDock Vina 1.1.2, AutoDock Tools 1.5., dan *Discovery Visual Analyzer*. Protein virus SARS-CoV-2 yang digunakan merupakan varian B.1.1.7 (PDB ID 7EDJ), dimana SGP varian B.1.1.7 berinteraksi dengan ACE2, yang dapat diunduh di *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB) [Yang et al, 2021]. Pemilihan ligan senyawa ekstrak Asparagus yang akan digunakan, diambil dari senyawa-senyawa yang telah ditemukan dalam studi terdahulu dan diambil 67 ligan untuk digunakan dalam studi ini [Jiménez-Sánchez et al, 2016].

METODE PENELITIAN

Struktur ligan yang digunakan untuk penambatan digunakan struktur 3 dimensinya, umumnya dapat diunduh di *PubChem Compound*. Namun, untuk ligan yang tidak tersedia data strukturnya Digambar bentuk 2 dimensinya menggunakan ACD Chem Sketch dan di dapat data dalam bentuk format .mol. Dengan bantuan Marvin Sketch struktur 2 dimensi ligan diubah menjadi struktur 3 dimensi dan disimpan dalam bentuk format .mol. Agar selanjutnya dapat diolah menggunakan AutoDock Tools, struktur 3 dimensi *software* Marvin Sketch merubah file dengan format .mol menjadi format .pdb dan dilanjutkan di proses menggunakan *Python Molecule Viewer*. Data struktur ligan ini disimpan dalam format .pdbqt. Selanjutnya data protein virus SARS-CoV-2 yakni varian B.1.1.7 (PDB ID 7EDJ) didapat dengan format .pdb melalui situs *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*. Protein atau SGP virus SARS-CoV-2 varian B.1.1.7 yang dipilih, merupakan SGP yang berikatan dengan ACE2 agar posisi optimum pada protein agar berikatan dengan ligan. Data protein yang sudah diunduh diolah menggunakan *Python Molecule Viewer* dan AutoDock Tools, untuk kemudian dihilangkan seluruh molekul air pada protein, ditambahkan kembali atom hidrogen polar, dan disimpan dalam format .pdbqt.

Optimasi Grid (Penentuan Tapak Aktif) (Morris et al. 2009)

Tapak aktif protein dicari dengan menggunakan struktur SGP yang telah berikatan dengan ACE 2. Struktur protein ini didapatkan dari RCSB PDB dengan PDB ID 7EDJ Setelah didapatkan tapak aktif protein dari 7EDJ yang berinteraksi fisik dengan ACE2, setelah itu dilakukan pengaturan grid. Nilai sumbu X, Y, dan Z dari bentuk protein diperlukan untuk konfigurasi *grid*, sehingga semua bagian sisi aktif tertutupi oleh kedudukan *grid box*. Keluaran

pengkondisian optimum tapak aktif disimpan dalam format.gpf.

Docking (Penambatan) (Morris et al. 2009)

Proses autogrid dilakukan untuk mensimulasikan hasil optimasi *grid* disimulasikan dengan menjalankan proses *autogrid*, yang dilanjutkan penentuan awalan parameter docking. Hal ini dilakukan dengan merancang fleksibilitas makromolekul dan juga ligan. Vina Config (vina.txt) dan AutoDock Vina masing-masing digunakan untuk memproses output dan mensimulasikan proses *docking*. Hasil keluarannya berupa format *ligan_out.pdbqt* yang menunjukkan nilai ΔG dan fail, yang mana dilanjutkan dengan *software* AutoDock untuk menganalisis dengan memilih *analyze*.

Visualisasi Hasil Docking

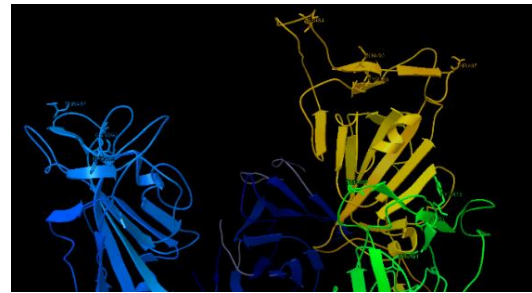
Visualisasi dan analisis lebih lanjut dilakukan dengan kompleks yang telah dalam format *ligan_out.pdbqt* menggunakan bantuan perangkat lunak Discovery Visual Analyzer untuk melihat tapak pengikatan dan interaksi ligan dengan protein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagai salah satu varian awal dimana kemunculannya menyebabkan pemicu gelombang pandemi COVID-19 [Yuan et al, 2020 & Murayama et al, 2021], varian B.1.1.7 atau varian alfa menjadi salah satu varian yang banyak dipelajari karena termasuk dalam varian yang diwaspadai atau *Variants of Concern* (VOC) [Jewell, 2021 & Williams et al, 2021]. Pasien yang terserang varian B.1.1.7 dapat mengalami kehilangan indera penciuman dan perasa, batuk, radang tenggorokan, *myalgia*, kelelahan, dan juga dapat meningkatkan keparahan penyakit dan risiko rawat inap [Jewell, 2021 & Bager et al, 2021]. Kemampuan penularan varian ini berkaitan dengan mutasi yang dimilikinya dimana peningkatan afinitas dengan reseptor sel tubuh manusia seperti ACE2, sehingga memungkinkan virus untuk berkembang biak dan menyebarkan infeksi dengan lebih baik [Davies et al, 2021; Peacock et al, 2020; & McCarthy et al, 2020]. Virus SARS-CoV-2 mengandung empat struktural protein, yakni protein *spike* (S), membran (M), envelop (E), and nukleokapsid (N), dimana protein *spike* memiliki peranan penting untuk virus masuk ke dalam tubuh manusia [Zhou et al, 2018 & Du et al, 2009]. Selain itu, *Spike* Glikoprotein (SGP) virus SARS-CoV-2 juga dimanfaatkan peneliti untuk membuat terapi, pengobatan, dan vaksin COVID-19 [Wang et al, 2016].

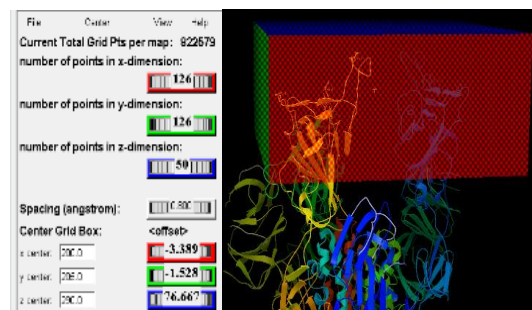
Secara umum, permukaan virus SARS-CoV memiliki dua komponen yakni, S1 yang mengandung *Receptor Binding Domain* (RBD) yang secara langsung berikatan dengan reseptor

seluler pada sel manusia; dan S2, yang mengandung peptida fusi yang dapat membaaur dengan membran sel manusia [Anand et al, 2003 & Perlman et al, 2009]. Untuk dapat masuk kedalam tubuh manusia, RBD virus SARS-CoV pada subunit S1 akan berikatan dengan reseptor ACE2 yang terdapat pada permukaan sel manusia [Perlman et al, 2009]. Patogenesis dipengaruhi interaksi antara SGP virus dengan ACE2, sehingga diharapkan saat interaksi SGP varian B.1.1.7 (PDB ID 7EDJ) dengan ACE2 dihilangi maka infeksi dapat dihentikan [Rolta et al, 2021]. Sebanyak tujuh residu pada SGP ini dipilih sebagai tapak aktif protein B.1.1.7. 7EDJ yaitu pada protein ASN 484, GLN 490, THR 497, TYR 450, PHE 487, TYR 446, dan LYS 414 yang diketahui telah berikatan langsung dengan reseptor ACE2 dan kemudian dilakukan grid sebagai tapak aktif virus, seperti terlihat pada Gambar 1. Tapak Aktif diandaikan seperti lubang yang dapat diisi oleh ligan.



Gambar 1 7EDJ Docking Site dan Gridbox

Pada penelitian ini menggunakan metode *oriented docking* sehingga hanya tapak aktif yang telah diketahui yang ditutupi. Gambar 2 menunjukkan posisi ketiga tapak aktif pada SGP. Tapak aktif *spike* protein yang berikatan dengan reseptor ACE2 memiliki titik pusat grid X, Y, dan Z kemudian diatur berturut-turut 200.0; 205.0; dan 290.0 dengan dimensi kubus X, Y, Z, berturut-turut 126, 126, 50 dengan nilai Å 0,800.

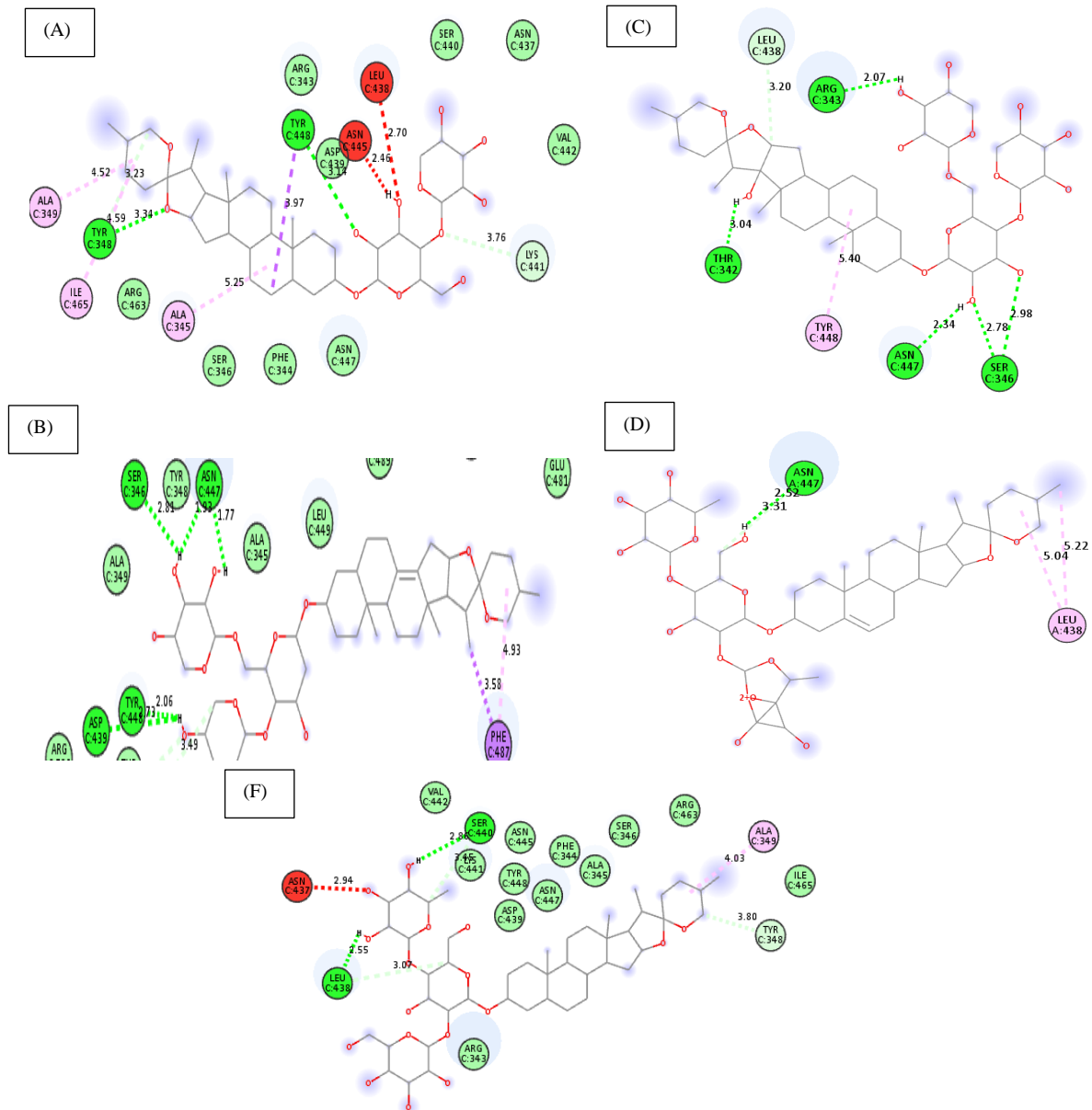


Gambar 2 Grid Box Position With 7EJD Docking Site

Penambatan ligan dengan protein dilakukan sesuai dengan tapak aktif protein yang

sudah ditentukan. Penambatan memiliki tujuan untuk memprediksi afinitas ikatan secara akurat dan menentukan bentuk pengikatan yang benar [Fu et al, 2018]. Interaksi antara ligan dan protein diamati menggunakan nilai ΔG . ΔG digunakan sebagai nilai prediksi interaksi karena dianggap dapat menentukan stabilitas kompleks protein-ligan [Du et al, 2016]. Hal ini dikarenakan

penurunan energi bebas pada sistem dapat mendorong interaksi protein-ligan berikatan secara spontan [Bronowska, 2011], sehingga senyawa ligan-protein dengan nilai ΔG terkecil dapat dijadikan acuan pemilihan senyawa untuk pengobatan COVID-19.



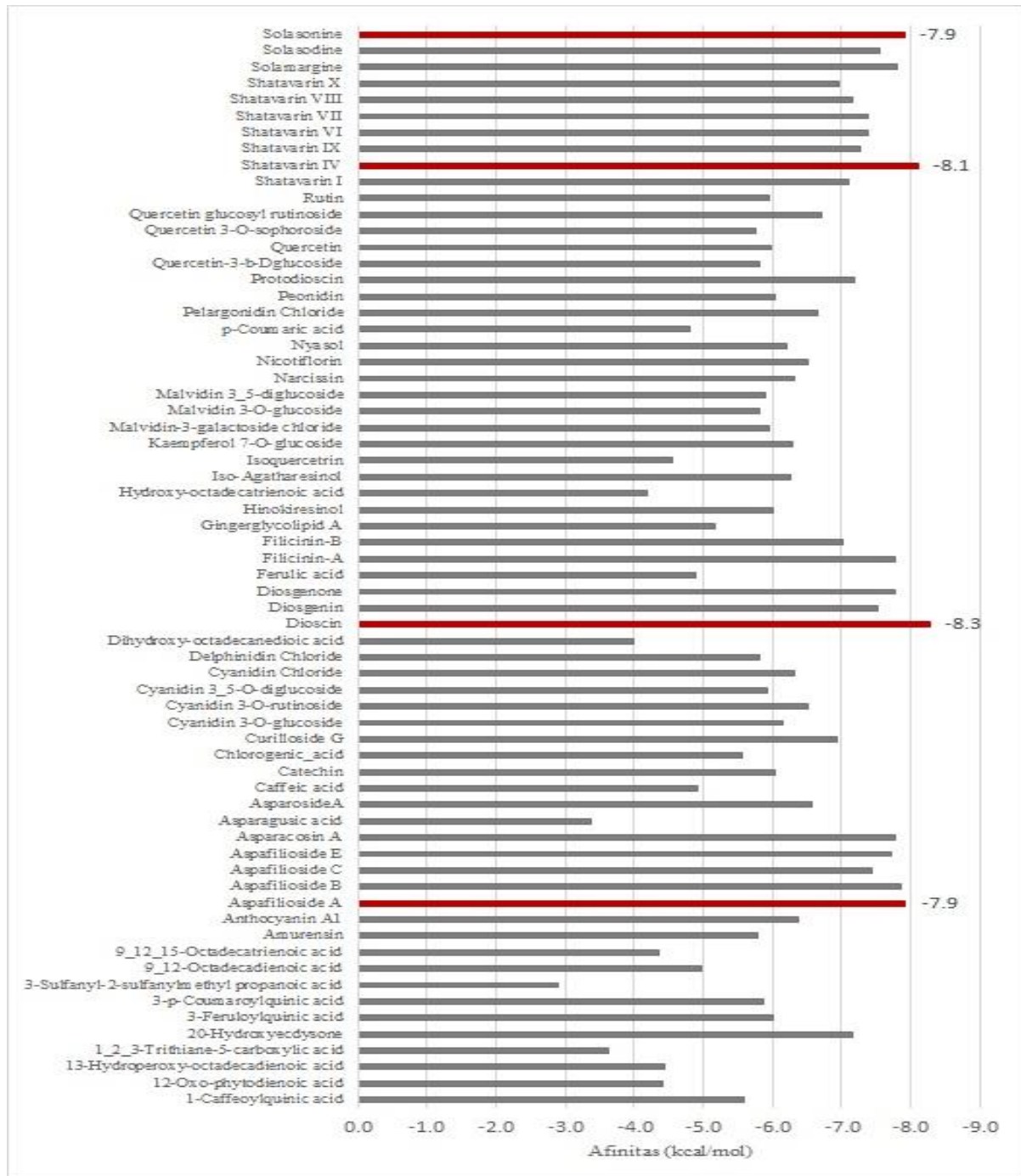
Gambar 3. Interaksi Aspafilioside A (A); Aspafilioside B (B); Aspafilioside E (C); Dioscin (D); dan Shatavarin IV (E) dengan protein SARS-CoV-2 dengan tampilan dua dimensi

Berdasarkan hasil penambatan 67 ligan-senyawa pada Gambar 4, terlihat dibandingkan dengan Aspafilioside B dan E, Aspafilioside A nilai ΔG Aspafilioside A (-7.9 kkal/mol) yang lebih rendah dibandingkan Aspafilioside B (-7.8 kkal/mol) dan E (-7.7 kkal/mol). Hal ini didukung dengan penggambaran interaksi 2 dimensi pada Gambar 3. Terlihat pada gambar

3A, interaksi Aspafilioside A antara lain, berikatan hidrogen dengan TYR448 & TYR348, dan interaksi hidrofobik dengan ALA349, ILE465, TYR448 & ALA345. Sedangkan Shatavarin IV dengan nilai ΔG lebih kecil dari Aspafilioside A, yakni -8.1 kkal/mol, memiliki interaksi ikatan hidrogen konvensional dengan SER440 & LEU438 dan interaksi hidrofobik

dengan ALA349. Dari Gambar 4 dapat terlihat bahwa senyawa Dioscin memiliki nilai yang paling baik diantara seluruh ligan dalam studi ini yakni -8.3 kkal/mol. Dimana interaksi yang berlangsung dengan protein virus SARS-CoV-2

adalah ikatan hidrogen konvensional dengan ASN447 dan interaksi hidrofobik dengan LEU438.



Gambar 4. Nilai ΔG dari 67 ligan ekstrak *Asparagus Sp.*

Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa Dioscin merupakan senyawa dalam ekstrak *Asparagus* yang dapat menjadi kandidat senyawa yang cukup potensial dan dijadikan acuan pembuatan obat yang langsung menghambat SGP virus karena berinteraksi paling baik dengan SGP

virus SARS-CoV-2 diantara 66 senyawa lainnya pada ekstrak asparagus.

DAFTAR PUSTAKA

- Alton, E. W., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., ... & Wolstenholme-Hogg, P. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(9), 684-691.
- Anand K, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR, Hilgenfeld. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*. 2003; 300:1763–7.
- Bager P, Wohlfahrt J, Fonager J, Albertsen M, Yssing Michaelsen T, Holten Møller C, et al. (2021). Increased risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in Denmark. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(11), 1507-1517.
- Bronowska, A. K., (2011), Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design, in J. C. Moreno-Pirajan (ed.), *Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases*, IntechOpen, London. 10.5772/19447.
- Burki T (2021) Understanding variants of SARS-CoV-2. *The Lancet*, 397(10273):462;
- Chikhale, R. V., Sinha, S. K., Patil, R. B., Prasad, S. K., Shakya, A., Gurav, N., ... & Gurav, S. S. (2021). In-silico investigation of phytochemicals from *Asparagus racemosus* as plausible antiviral agent in COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(14), 5033-5047.
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., ... & Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England. *Science*, 372(6538), eabg3055.
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., & Jiang, S. (2009). The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 226-236.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., ... & Liu, S. Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 144.
- Esquenazi, D., Wigg, M. D., Miranda, M. M., Rodrigues, H. M., Tostes, J. B., Rozental, S., ... & Alviano, C. S. (2002). Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn.(Palmae) husk fiber extract. *Research in microbiology*, 153(10), 647-652.
- Faria, N. R., Claro, I. M., Candido, D., Franco, L. M., Andrade, P. S., Coletti, T. M., ... & Sabino, E. C. (2021). Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. *Virological*, 372, 815-821.
- FDA <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/why-you-should-not-use-ivermectin-treat-or-prevent-covid-19?msclkid=101e497fcfc11ec8327153a3cc857c3> akses 10 April 2022 pukul 08.34
- Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: A case of oligopeptide binding protein. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2018.
- He, Y., Li, J., Li, W., Lustigman, S., Farzan, M., & Jiang, S. (2006). Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronaviruses by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *The Journal of Immunology*, 176(10), 6085-6092.
- Jassim, S. A., & Naji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of applied microbiology*, 95(3), 412-427.
- Jewell, B. L. (2021). Monitoring differences between the SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 variant and other lineages. *The Lancet Public Health*, 6(5), e267-e268.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS2 metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 46, 78-87.
- Kaufman, J. (2022). The Use of Nebulizer Medications as an Effective Treatment for COVID-19. <https://digitalcommons.murraystate.edu/scholarsweek/Spring2022/HON/1/> akses 9 mei 2022 pukul 20:03
- Khairnar, S. V., Jain, D. D., Tambe, S. M., Chavan, Y. R., & Amin, P. D. (2022). Nebulizer systems: a new frontier for therapeutics and targeted delivery. *Therapeutic Delivery*, 13(1), 31-49.
- Kupferschmidt, K. (2020). Mutant coronavirus in the United Kingdom sets off alarms, but its importance remains unclear. *Science*.
- Lokugamage, M. P., Vanover, D., Beyersdorf, J., Hatit, M. Z., Rotolo, L., Echeverri, E. S., ... & Dahlman, J. E. (2021). Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nature biomedical engineering*, 5(9), 1059-1068.

- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 395(10224), 565-574.
- McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, et al. Natural deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *BioRxiv*. 2020:2020.11.19.389916.
- Medeiros-Ribeiro, A. C., Aikawa, N. E., Saad, C. G., Yuki, E. F., Pedrosa, T., Fusco, S. R., ... & Bonfa, E. (2021). Immunogenicity and safety of the CoronaVac inactivated vaccine in patients with autoimmune rheumatic diseases: a phase 4 trial. *Nature medicine*, 27(10), 1744-1751.
- Mohammed, F. S., Pehlivan, M., Sevindik, E., Akgul, H., Sevindik, M., Bozgeyik, I., & Yumrutas, O. (2021). Pharmacological properties of edible *Asparagus acutifolius* and *Asparagus officinalis* collected from North Iraq and Turkey (Hatay). *Acta Alimentaria*, 50(1), 136-143.
- Murayama, H., Kayano, T., & Nishiura, H. (2021). Estimating COVID-19 cases infected with the variant alpha (VOC 202012/01): an analysis of screening data in Tokyo, January-March 2021. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 18(1), 1-5.
- Peacock, T. P., Goldhill, D. H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O. C., ... & Barclay, Indonesia, P. D. P., Indonesia, P. D. S. K., Anesthesiologi, P. D., Indonesia, T. I., & Indonesia, I. D. A. (2020). *Pedoman Tatalaksana COVID-19*. PDPI, 4.
- 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.
- Villoutreix, B. O., Calvez, V., Marcelin, A. G., & Khatib, A. M. (2021). In silico investigation of the new UK (B. 1.1. 7) and South African (501y. v2) SARS-CoV-2 variants with a focus at the ace2-spike rbd interface. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1695.
- Wang, Q., Wong, G., Lu, G., Yan, J., & Gao, G. F. (2016). MERS-CoV spike protein: targets for vaccines and therapeutics. *Antiviral research*, 133, 165-177.
- Williams, H., Hutchinson, D., & Stone, H. (2021). The evolution and impact of COVID-19 variants B. 1.1. 7, B. 1.351, P. 1 and B. 1.617. *Global Biosecurity*, 3(1), NA-NA.
- W. S. (2020). The furin cleavage site of SARS-CoV-2 spike protein is a key determinant for transmission due to enhanced replication in airway cells. *BioRxiv*, 2020-09.
- Pemulihan Ekonomi | Covid19.go.id akses 9 mei 2022 pukul 19:17
- Penanganan Kesehatan | Covid19.go.id akses 9 mei 2022 pukul 19:22
- Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, 7(6), 439-450.
- Peta Sebaran | Covid19.go.id akses 20 Desember 2023 pukul 19:08
- Ramírez-Salinas, G. L., Martínez-Archundia, M., Correa-Basurto, J., & García-Machorro, J. (2020). Repositioning of ligands that target the spike glycoprotein as potential drugs for SARS-CoV-2 in an in silico study. *Molecules*, 25(23), 5615.
- Rolta, R., Salaria, D., Sharma, P., Sharma, B., Kumar, V., Rathi, B., ... & Dev, K. (2021). Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* inhibit spike protein of SARS-CoV-2 binding to ACE2 receptor: in silico approach. *Current pharmacology reports*, 7, 135-149.
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., ... & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 581(7807), 221-224.
- Tso, H. C., Ho, M. R., ... & Hsu, S. T. D. (2021). Effect of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 mutations on spike protein structure and function. *Nature structural & molecular biology*, 28(9), 731-739.
- Yele, V., Sanapalli, B. K. R., & Mohammed, A. A. (2022). Imidazoles and benzimidazoles as putative inhibitors of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 (Alpha) and P. 1 (Gamma) variant spike glycoproteins: A computational approach. *Chemical Papers*, 1-11.
- Yuan, J., Li, M., Lv, G., & Lu, Z. K. (2020). Monitoring transmissibility and mortality of COVID-19 in Europe. *International Journal of Infectious Diseases*, 95, 311-315.
- Zaidi, A. K., & Dehgani-Mobaraki, P. (2021). The mechanisms of action of Ivermectin against SARS-CoV-2: An evidence-based clinical review. *J Antibiot (Tokyo)*.
- Zhang, H., Birch, J., Pei, J., Ma, Z. F., & Bekhit, A. E. D. (2019). Phytochemical compounds and biological activity in *Asparagus* roots: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 966-977.
- Zhou, Y., Jiang, S., & Du, L. (2018). Prospects for a MERS-CoV spike vaccine. *Expert review of vaccines*, 17(8), 677-686.