

Analisis In Silico Potensi Hesperidin sebagai Inhibitor Main Protease (Mpro) Pada SARS CoV-2 dan Reseptor Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2)

Elvira Yunita¹, Umar Yahya², Novriantika Lestari³, Mardhatillah Sariyanti⁴, Hernita Taurustya³

¹Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Universitas Bengkulu

²Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu

³Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu

⁴Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu

Email Korespondensi : elvirayunita@unib.ac.id

ABSTRAK

Latar Belakang: Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) dan proses transkripsi dari genome RNA virus oleh Main Protease (Mpro) memiliki peran penting sebagai mekanisme patogenesis virus Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Penghambatan aktivitas ACE-2 dan Mpro menggunakan berbagai senyawa seperti hesperidin yang terkandung dalam buah kalamansi (*Citrus microcarpa*) khas Bengkulu menjadi salah satu target pengobatannya. Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan senyawa hesperidin dari golongan flavonoid dalam berinteraksi dengan sisi aktif ACE-2 dan Mpro menggunakan metode molecular docking.

Metode: Penelitian secara in silico dengan menggunakan metode molecular docking pada struktur 3D ACE-2 (PDB ID 1R4L) dan Mpro (PDB ID 7JQ1) terhadap Hesperidin yang diambil dari situs database Protein Data Bank dan diolah dengan program BIOVIA Discovery Studio dan Autodock Vina.

Hasil: Analisis skor docking dan ikatan ligan dan sisi aktif ACE-2 serta Mpro menunjukkan bahwa keduanya memiliki ikatan spontan (ΔG -12,1 kkal/mol pada ACE-2 dan -9.5 kkal/mol pada Mpro) terhadap hesperidin dan dapat mengikat pada sisi aktif reseptor. Hesperidin hanya memenuhi satu dari tiga kriteria Lipinski's Rule of five sehingga hesperidin dapat dikembangkan sebagai obat non-oral.

Kesimpulan: Hesperidin dapat membentuk ikatan secara spontan ($\Delta G < 0$) pada sisi aktif protein ACE-2 dan Mpro berdasarkan hasil molecular docking. Ikatan antara senyawa hesperidin lebih kuat dengan protein ACE-2 dibandingkan dengan protein Mpro. Hesperidin dapat berpotensi sebagai kandidat obat baru sebagai inhibitor ACE-2 dan aktivitas Mpro.

Kata Kunci: SARS-CoV-2, Reseptor ACE-2, Mpro, Hesperidin, In Silico

ABSTRACT

Background: Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) and transcription process of the viral RNA genome by Main Protease (Mpro) are have an important role as a mechanism for the pathogenesis of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Inhibition of Mpro and ACE-2 activities using various compounds such as hesperidin contained in Kalamansi fruit (*Citrus microcarpa*) became one of the treatment targets. This study aims to determine the ability of hesperidin compounds from the flavonoid group to interact with the active site of ACE-2 and Mpro using the molecular docking method.

Methods: An in silico study using the molecular docking method on the 3D structure of ACE-2 (PDB ID 1R4L) and Mpro (PDB ID 7JQ1) on Hesperidin taken from the Protein Data Bank database site and processed with the BIOVIA Discovery Studio and Autodock Vina programs.

Results: Analysis of docking scores and ligand binding and active sites of ACE-2 and Mpro showed that both had spontaneous binding (ΔG -12.1 kcal/mol on ACE-2 and -9.5 kcal/mol on Mpro) to hesperidin and could bind on the active site of the receptor. Hesperidin only meets one of the three criteria of Lipinski's Rule of five so that hesperidin can be developed as a non-oral drug.

Conclusion: Hesperidin can form bonds spontaneously ($\Delta G < 0$) on the active site of ACE-2 and Mpro proteins based on molecular docking results. The bond between hesperidin compounds was stronger

with ACE-2 protein than with Mpro protein. Hesperidin can potentially be a new drug candidate as an ACE-2 inhibitor and Mpro activity.

Keywords: SARS-CoV-2, ACE-2 receptor, Mpro, Hesperidin, In Silico

PENDAHULUAN

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) merupakan virus penyebab Corona Virus Disease (Covid-19), Penyakit menular yang dapat menyebabkan sindrom pernapasan akut. Covid-19 pertama kali ditemukan di Wuhan, Provinsi Hubei, China pada Desember 2019. World Health Organization (WHO) mendeklarasikan Covid-19 sebagai pandemi pada 11 maret 2020¹. WHO telah mencatat sebanyak 181.521.067 kasus terkonfirmasi diseluruh dunia per tanggal 30 Juni 2021. Kasus terkonfirmasi di Indonesia sudah mencapai 2.178.272 dan sebanyak 10.103 di Provinsi Bengkulu².

Salah satu terapi yang tengah dikembangkan yaitu dengan menghambat patogenesis infeksi virus melalui proses transkripsi dan replikasi dari SARS-CoV-2. Transkripsi dari genome RNA yang ada di dalam sel, akan membentuk polipeptida oleh protease utama (Main Protease dikenal juga dengan Mpro atau trypsin-like protease) pada 11 situs berbeda untuk membentuk berbagai bahan yang digunakan dalam proses replikasi virus. Fungsi utama dari Mpro yaitu melepaskan polipeptida fungsional dari poliprotein melalui proses proteolitik. Terdapat dua poliprotein yang diperlukan untuk replikasi dan transkripsi coronavirus, antara lain poliprotein 1a/1b (pp1a dan pp1b)³. Mekanisme lain yang dapat dikendalikan dalam patogenesis dari SARS-CoV-2 yaitu dengan menghambat proses entry virus kedalam sel inang. SARS-CoV-2 memiliki spike yang tersusun dari glikoprotein yang akan menempel pada angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) sebagai reseptor. ACE-2 telah diketahui berada di berbagai jaringan di tubuh manusia, namun secara spesifik berada di sel epitel alveolar⁴.

Kedua mekanisme diatas memiliki peran utama dalam proses patogenesis dari SARS-CoV-2. Penghambatan atau penekanan aktivitas dari Mpro dan ACE-2 dapat menjadi salah satu target dalam pengendaliannya. Berbagai riset telah dilakukan untuk menemukan sejumlah senyawa yang dapat menghambat patogenesis tersebut, seperti obat antivirus, antijamur, antiparasit sampai senyawa natural. Hesperidin dari golongan flavonoid telah diketahui dapat mempengaruhi ACE-2 dan main protease SARS-CoV-2⁵. Penelitian sebelumnya telah berhasil mengidentifikasi berbagai senyawa yang ada pada buah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa*) dan jeruk gerga (*Citrus reticulata*) menganalisis potensi antioksidannya⁶. Penelitian tersebut menyatakan bahwa terdapat berbagai senyawa golongan flavonoid, salah satunya yaitu hesperidin⁷. Penelitian lain menyebutkan bahwa kandungan hesperidin mencapai 24.3 mg/100 mL dalam jus *C. reticulata*. Hasil identifikasi tersebut menjadi dasar peneliti memprediksi kemungkinan adanya hubungan hesperidin dengan ACE-2 dan Mpro⁵.

Penelitian ini dilakukan secara *in silico*, dengan menggunakan perangkat komputer, sehingga dapat memprediksi ikatan antar molekul tanpa melakukan eksperimen secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hal ini dapat membuka peluang yang besar bagi penelitian agar dapat berjalan secara efisien⁸. Hingga saat ini, penelitian menggunakan metode komputasi atau *in silico* masih sangat terbatas. Oleh karena itu peneliti tertarik mengetahui aktivitas Mpro dan ACE-2 dengan hesperidin secara *in silico*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan komputer jinjing merk ASUS ROG GL553VD dengan spesifikasi intel core i7, RAM 8GB, Graphic Card NVIDIA GEFORCE GTX 1050 dilengkapi dengan beberapa perangkat lunak diantaranya yaitu Autodesk tools, Autodesk vna, dan Biovia Discovery Studio. Komponen lainnya yang digunakan pada penelitian ini yaitu sekuen senyawa hesperidin yang di unduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> serta protein ACE-2 dan Mpro dalam format (.pdb) yang di unduh melalui <https://www.rcsb.org>. Senyawa hesperidin dengan ID 10621 diunduh dengan format SDF 3D (SQL Server Compact Database File). Berkas 3D senyawa kemudian disimpan dengan format SDF di dalam direktori direktori kerja.

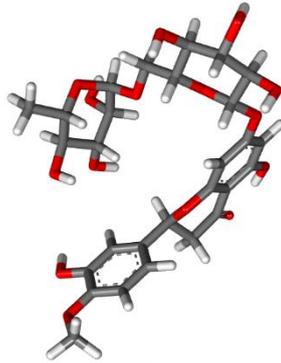
Struktur Kristal ACE-2 diunduh di laman penyimpanan data protein yaitu Protein Data Bank <https://www.rcsb.org> dengan PDB ID 1R4L. ACE-2 yang dipilih memiliki native ligand yaitu ((S,S)-2-CARBOXY-2-[3-(3,5-DICHLORO-BENZYL)-3H-IMIDAZOL-4-YL]-ETHYLAMINO)-4-METHYL PENTANOIC ACID, 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose, Zn dan Cl) (4). Struktur 3 dimensi dari Mpro (PDB ID. 7JQ1) terdiri dari tiga domain. Domain I dan II memiliki bentuk β -sheet dan domain III membentuk α -helix. native ligand yang aktif pada Mpro yaitu VHJ401. (N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N-[(2S)-1-hydroxy-3-[(3R)-2-oxo-3,4-dihydro-2H-pyrrol-3-yl]propan-2-yl]-L-phenylalaninamide). Native ligand digunakan untuk melakukan validasi pada penelitian ini⁹.

Senyawa Hesperidin kemudian di analisis kriteria Lipinski's Rule of five. Kriteria ini diperlukan untuk mengetahui apakah kandidat obat tersebut dapat terdistribusi dengan baik dan digunakan sebagai obat oral. Pengujian kriteria ini dapat dilakukan dengan mengakses situs <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Persiapan protein yang akan dilakukan proses docking meliputi cleaning molekul yang tidak diperlukan seperti air dan native ligand untuk mengoptimalkan ikatan antara protein dan senyawa yang akan dilakukan proses docking serta penyimpanan dalam format pdbqt.

Proses docking dimulai dari pemilihan hesperidin sebagai ligand. Proses docking dilanjutkan dengan pembuatan grid box untuk mengetahui ruang penambatan senyawa dengan molekul dan didapatkan center_x = 24.938, center_y = 1.957, center_z = -12.777, size_x = 64, size_y = 64, size_z = 40. Area yang didapatkan dari pembuatan grid box ini digunakan untuk mengetahui area yang diperlukan dalam proses docking yang nantinya akan dimasukkan kedalam konfigurasi autodock vina. Proses docking yang dilakukan dalam program command prompt dan dimasukkan perintah: vina.exe - -config config.txt --log log.txt --out mproxhesperidin.pdbqt.

HASIL

Berkas senyawa hesperidin yang digunakan dalam penelitian memiliki tampilan seperti pada gambar 4.1. Hasil pengunduhan senyawa hesperidin diketahui telah terpisah dengan molekul air dan diketahui nilai berat molekul, nilai LogP, *H-Bond Donor* dan *H-Bond Aceptor* sehingga memudahkan peneliti dapat menganalisis kriteria *Lipinski's Rule of five*.

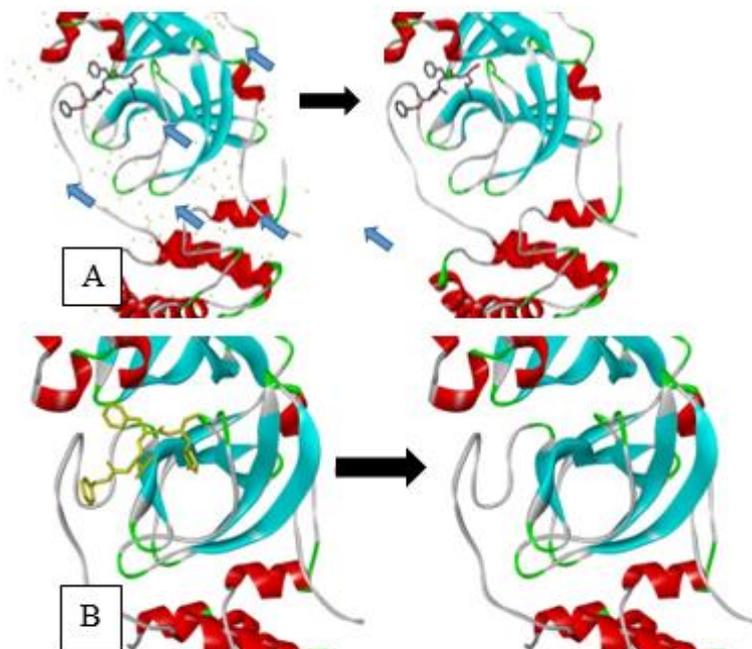


Gambar 4.1 Tampilan Senyawa Hesperidin

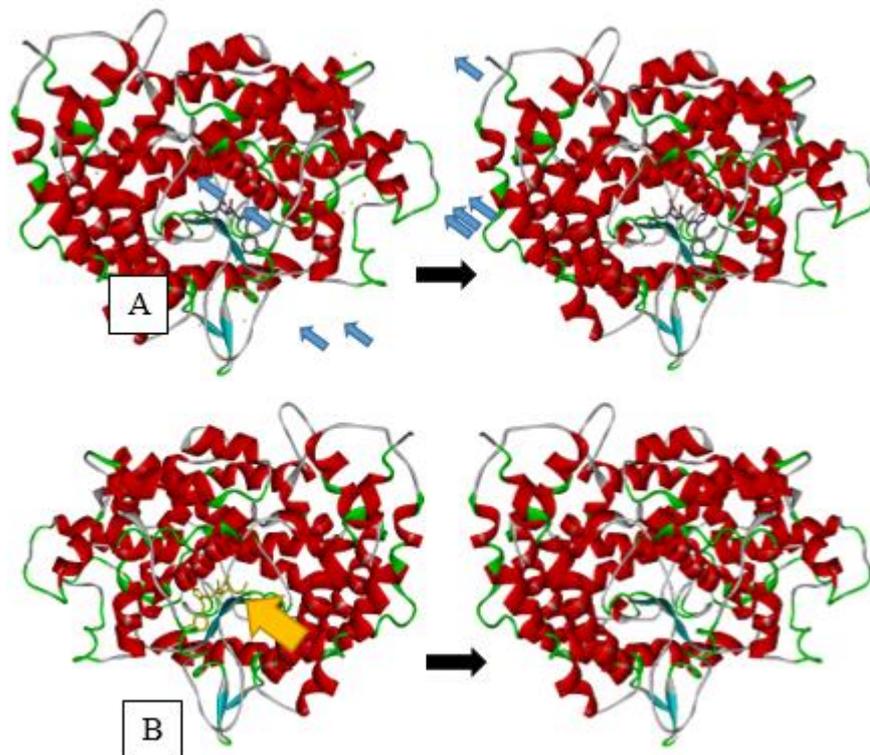
Hasil analisis *Lipinski's Rule of five* pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa struktur senyawa hesperidin memenuhi salah satu syarat yaitu $\text{LogP} < 5$. Kriteria lain yang tidak dapat dipenuhi antara lain berat molekul > 500 Da, ikatan hidrogen donor > 5 , ikatan hidrogen aseptor > 10 . *Lipinski's Rule of five* dapat menjadi kriteria penemuan kandidat obat oral karena dapat menentukan karakter lipofilik/lipofobik suatu senyawa melalui membran sel secara difusi pasi¹⁰.

Tabel 4.1 Hasil Kriteria *Lipinski's Rule of Five*

Kriteria	Hesperidin
Berat Molekul (<500 Da)	610,57
LogP (<5)	-1.156
H-Bond donor (<5)	8
H-Bond acceptor (<10)	15



Gambar 4.2 *Water Molecule Cleaning* (A), *Native Ligand Cleaning* (B), protein Mpro dalam program BIOVIA Discovery Studio



Gambar 4.3 Water Molecule Cleaning (A), Cleaning Native Ligand (B), protein ACE-2 dalam program BIOVIA Discovery Studio

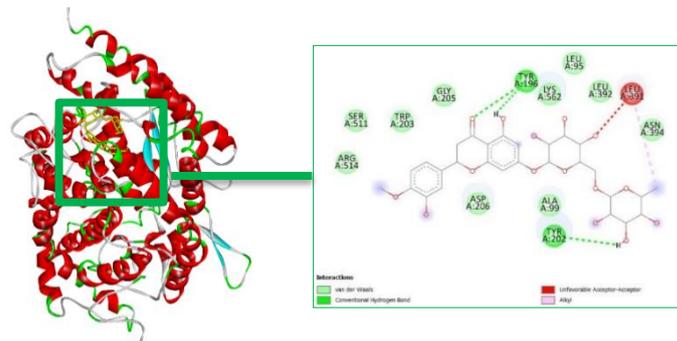
Proses *docking* dimulai dari pembuatan *grid box* untuk mengetahui ruang penempatan senyawa dengan molekul dan didapatkan **center_x = 24.938, center_y = 1.957, center_z = -12.777, size_x = 64, size_y = 64, size_z = 40**. Area yang didapatkan dari pembuatan *grid box* ini digunakan untuk mengetahui area yang diperlukan dalam proses *docking* yang nantinya akan dimasukkan kedalam konfigurasi *autodock vina*. Proses *docking* yang dilakukan dalam program *command prompt* dan dimasukkan perintah: **vina.exe --config config.txt --log log.txt --out mproxhesperidin.pdbqt**. kemudian *enter*. Durasi proses *docking* akan bergantung pada spesifikasi perangkat yang digunakan.

Hasil dari *docking molecular* pada penelitian ini dilakukan dengan menganalisis energi bebas Gibbs, ikatan hidrogen serta residu asam amino yang dapat dilihat pada tabel dan visualisasi 2 dan 3 dimensi. Tabel 4.2 memperlihatkan hasil *docking score* pada ACE-2 dan Mpro dengan hesperidin masing-masing sebesar: **ACE-2 = -12,1 kkal/mol dan Mpro -9,5 kkal/mol**.

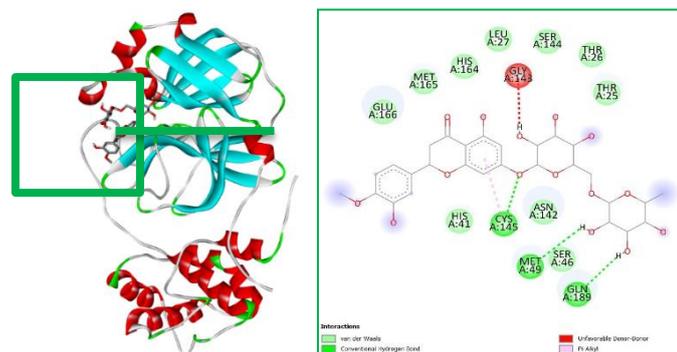
Tabel 4.2 Nilai Energi Bebas (ΔG) Hasil *Docking*

Reseptor	ΔG (kkal/mol)
ACE-2	-12,1
Mpro	-9.5

Pada gambar 4.5 dan gambar 4.6 memperlihatkan hasil *docking* senyawa hesperidin dengan protein ACE-2 serta dituliskan dalam tabel 4.3 yang menunjukkan adanya beberapa ikatan van der Walls dengan residu asam amino *Arginine514*, *Serine511*, *Tryptophan203*, *Glycine205*, *Lysine562*, *Leucine92*, *Leucine392*, *Asparagine394*, *Aspartic Acid206*, *Alanine99* ikatan acceptor-acceptor dengan *Leucine391* ikatan alkyl dengan *Leucine391*, serta ikatan hidrogen dengan *Tyrosine196*, *Tyrosine202*. Hasil *docking* senyawa hesperidin dengan protein Mpro menghasilkan ikatan van der Walls dengan residu asam amino *Glutamine166*, *Methionine165*, *Histidine164*, *Leucine27*, *Serine144*, *Threonine26*, *Threonine25*, *Histidine41*, *Asparagine142*, *Serine 46*, terdapat pula ikatan donor-donor dengan *Glycine143*, ikatan Pi-Alkyl dengan *Cystidine145*, serta ikatan hidrogen dengan *Cystidine145*, *Methionine49* dan *Glutamine189*.



Gambar 4.4 Struktur 2D dan 3D ACE2 x Hesperidin



Gambar 4.5 Struktur 2D dan 3D Mpro x Hesperidin

Tabel 4.3 Hasil Visualisasi Struktur 2D Senyawa Hesperidin terhadap Protein

Protein	Jenis Ikatan
ACE-2	Ikatan Van der waals <i>Arginine514</i> , <i>Serine511</i> , <i>Tryptophan203</i> , <i>Glycine205</i> , <i>Lysine562</i> , <i>Leucine92</i> , <i>Leucine392</i> , <i>Asparagine394</i> , <i>Aspartic Acid206</i> , <i>Alanine99</i>
	Ikatan Hidrogen <i>Tyrosine196</i> , <i>Tyrosine202</i> .
Mpro	Ikatan van der waals <i>Glutamine166</i> , <i>Methionine165</i> , <i>Histidine164</i> , <i>Leucine27</i> ,

*Serine144, Threonine26,
Threonine25, Histidine41,
Asparagine142, Serine 46*

Ikatan Hidrogen
*Cystidine145, Methionine49 dan
Glutamine189*

PEMBAHASAN

Struktur 3D Hesperidin telah tersedia di situs pubchem dan perlu dilakukan proses preparasi berupa konversi dari format .SDF menjadi .pdbqt karena aplikasi docking molecular hanya akan optimal jika menggunakan format .pdbqt. Senyawa yang akan di gunakan sebagai kandidat obat baru perlu dilakukan uji kriteria. Salah satunya yaitu Lipinski's Rule of five untuk mengetahui apakah kandidat obat tersebut dapat terdistribusi dengan baik dan digunakan sebagai obat oral. Kriteria ini mengukur berat molekul, nilai LogP, jumlah hidrogen donor, jumlah hidrogen reseptor, serta pelanggaran/violation yang terjadi. Kriteria ini digunakan untuk mengukur seberapa mirip atau sesuainya suatu senyawa yang akan dijadikan sebuah kandidat obat dengan Druglikeness Properties¹⁰.

Pada penelitian kali ini didapatkan data bahwa hesperidin memiliki besar molekul 610,57 Da (> 500 Da), ikatan hidrogen donor 8 (> 5), ikatan hidrogen aseptor 15 (> 10). Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa hesperidin memiliki 3 kriteria yang tidak memenuhi Lipinski's Rule of five namun telah diujikan kemampuan antivirus terhadap rotavirus, sehingga kemampuan antivirus dari hesperidin tidak dapat diabaikan dan dapat diajukan untuk kesimpulan farmakologi lebih lanjut¹¹.

Proses penambatan molekular pada penelitian ini menggunakan fungsi skoring energi bebas ikatan sebagai parameternya, yang akan menghasilkan luaran berupa energi bebas ikatan (ΔG_{bind}) yang dapat mempresentasikan kekuatan/kestabilan konformasi ikatan yang dihasilkan dari docking antara protein dan ligand. Hasil scoring ini menunjukkan tingkat kestabilan ikatan yang terjadi. Jika $\Delta G < 0$ terjadi rekasi spontan, jika $\Delta G = 0$ terjadi ikatan tidak spontan, sedangkan jika $\Delta G > 0$ maka tidak ada ikatan yang terjadi. Semakin kecil angka yang didapat, maka ikatan yang terjadi semakin stabil. Ikatan hidrogen merupakan interaksi/ikatan atom H dengan atom yang memiliki nilai elektronegatif yang tinggi, seperti oksigen (atom O), nitrogen (Atom N), dan Flour). Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang ideal dalam interaksi obat karena bersifat Reversible. Sedangkan ikatan van der Waals merupakan salah satu contoh ikatan hidrofobik yang merupakan ikatan yang lebih lemah afinitasnya, ikatan ini terjadi dengan adanya tarik menarik antar molekul atau atom yang tidak bermuatan. Konstanta afinitasnya yaitu sebesar $0 > k_1/k_2 < 1$ ¹².

Penelitian yang dilakukan antara senyawa hesperidin terhadap ACE-2 dan Mpro kali ini mendapatkan hasil yaitu nilai energi bebas (ΔG) = -12,1 kkal/mol untuk ACE-2 dan -9,5 kkal/mol untuk Mpro dengan nilai root-mean-square deviation (RSMD) < 2. Hal ini menunjukkan bahwa kedua ikatan dapat bereaksi secara spontan dan menunjukkan nilai energi bebas (ΔG) ACE-2 lebih rendah dan lebih spontan dibandingkan dengan Mpro hal ini sebanding dengan penelitian yang dilakukan oleh yang menunjukkan bahwa hesperidin dapat berikatan secara spontan dengan main protease (Mpro) pada SARS-CoV-2. Selain itu, residu asam amino yang berperan sebagai sisi aktif dari Mpro yaitu cys145

dan his41 juga didapatkan telah berikatan secara van der Waals dan hidrogen dengan senyawa hesperidin pada penelitian ini¹³. Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh bahwa protein ACE-2 memiliki salah satu sisi aktif yaitu pada residu asam amino Asparagin514 ketika ditambahkan dengan senyawa Apiin. Senyawa hesperidin dapat berikatan secara konstan dengan protein ACE-2, maka protein ACE-2 telah memiliki inhibitor pada sisi aktifnya sehingga spike pada virus SARS-CoV-2 tidak dapat mengikat pada reseptor ACE-2¹⁴. Sehingga virus SARS-CoV-2 tidak dapat masuk ke dalam sel target dan melakukan berbagai mekanisme patogenesis¹⁵.

ACE-2 merupakan glikoprotein integral membran yang ada di hampir seluruh jaringan tubuh manusia. Ekspresi tertinggi ACE-2 diketahui berada pada pernafasan, saluran pencernaan dan jantung. Protein ini banyak diekspresikan pada membran sel epitel paru-paru yang merupakan jalur utama masuknya virus ke dalam tubuh manusia. Peran ACE-2 sebagai entry site merupakan kunci penting sebagai reseptor SARS-CoV-2 ke dalam tubuh manusia dan merupakan awal dari patogenesisnya. Oleh karena itu, proses pengembangan obat untuk menghambat reseptor ACE-2 ini terus dikembangkan agar SARS-CoV-2 tidak memiliki reseptor untuk masuk ke dalam sel epitel paru-paru manusia. Hal ini menjadi salah satu keuntungan karena dapat menghambat aktivitas virus di dalam tubuh manusia sehingga tidak terjadi proses patogenesis dari SARS-CoV-2¹⁴.

Main protease pada SARS-CoV-2 memegang peranan penting dalam dalam memproses poliprotein yang akan melakukan translasi RNA dalam replikasi virus SARS-CoV-2. Proses inhibisi Mpro bertujuan untuk menghambat terjadinya replikasi SARS-CoV-2. Hal ini dapat menghentikan siklus hidup virus sehingga virus tidak dapat menyebar dan melakukan berbagai proses patogenesis. Pengembangan kandidat obat untuk inhibitor Mpro ini terus dikembangkan untuk dapat menangani wabah covid 19¹⁶.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa. Hesperidin dapat membentuk ikatan secara spontan ($\Delta G < 0$) pada sisi aktif protein ACE-2 dan Mpro berdasarkan hasil molecular docking. Ikatan antara senyawa hesperidin lebih kuat dengan protein ACE-2 (-12,1 kkal/mol) dibandingkan dengan protein Mpro (-9.5 kkal/mol). Hesperidin dapat berpotensi sebagai kandidat obat baru sebagai inhibitor ACE-2 dan aktivitas Mpro. Hesperidin dapat dikembangkan sebagai obat non oral karena hanya memenuhi salah satu kriteria Lipinski's Rule of five.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog* [Internet]. 2020;16(5):1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008536>.
2. Satuan Tugas Penanganan COVID-19. No Title [Internet]. 2021 [cited 2021 Apr 24]. Available from: <https://covid19.go.id/>
3. Fakhri TM, Dewi ML. UTAMA (Mpro) SEBAGAI MAKROMOLEKUL TARGET INHIBITOR NOVEL CORONAVIRUS 2019 (SARS-CoV-2) SECARA IN SILICO. 2020;3(2):84–91.
4. Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Ryan D, Tang J, et al. Native Human Angiotensin Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) [Internet]. *www.rcsb.org*. 2004. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/1R4I>
5. Bellavite P, Donzelli A. Hesperidin and SARS-CoV-2: New light on the healthy function of citrus fruits. *Antioxidants*. 2020;9(8):1–18.
6. Yunita E, Kurniati T, Sipriyadi, Melati P, Lestari N. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jeruk Kalamansi (*Citrus microcarpa*), Jeruk Gerga (*Citrus Reticulate*) dan Buah Mangrove (*Sonneratia alba*) Dari Provinsi Bengkulu. *Nat Penelit Pengelolaan Sumberd Alam dan Lingkungan*. 2021;10(1):253–61.
7. Yunita E, Kurniati T, Rosa FL, Melati P, Lestari N. Short Communication: Analysis of detected metabolites compounds from the crude extract of Rimau Gerga Lebong oranges fruit (*Citrus reticulata* ‘RGL’) using LC-QTOF-MS/MS. *Biodiversitas*. 2022;23(7):3778–83.
8. Khaerunnisa S, Suhartati, Awaluddin R. Penelitian IN SILICO Untuk Pemula. Airlangga University Press; 2020.
9. Yang K, Liu W. Structure of the SARS-CoV-2 main protease in complex with inhibitor MPI4 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/7JQ1>
10. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;64(SUPPL.):4–17.
11. Bhowmik D, Nandi R, Prakash A, Kumar D. Evaluation of flavonoids as 2019-nCoV cell entry inhibitor through molecular docking and pharmacological analysis. *Heliyon*. 2020;7(8).
12. Vinsiah R, Fadhillah F. Studi Ikatan Hidrogen Sistem Metanol-Metanol dan Etanol-Etanol dengan Metode Molekular Dinamik. *Sainmatika J Ilm Mat dan Ilmu Pengetah Alam*. 2018;15(1):14.
13. s S, Sarmah S, Lyndem S, Singha Roy A. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2020;0(0):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201>.
14. Koentjoro MP, Donastin A, Prasetyo EN. Potensi Senyawa Bioaktif Tanaman Kelor Penghambat Interaksi Angiotensin-Converting Enzyme 2 Pada Sindroma Sars-Cov-2. *J Bioteknol Biosains Indones*. 2020;7(2):259–70.
15. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al.

SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8.

16. Yudi Utomo R, Meiyanto E. Revealing the Potency of Citrus and Galangal Constituents to Halt SARS-CoV-2 Infection. 2020;2(March):1–8. Available from: www.who.int;