



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00202030640, 2 September 2020

Pencipta

Nama : **Dr. Teresa Liliana Wargasetia, S.Si., M.Kes., PA(K)., Dr.dr. Hana Ratnawati, M.Kes. dkk**

Alamat : Jl. Baladewa Asri II No.38 RT.007 RW 010, Bandung, Jawa Barat, 40173

Kewarganegaraan : Indonesia

Pemegang Hak Cipta

Nama : **Universitas Kristen Maranatha**

Alamat : Jl. Prof. Drg. Surya Sumantri, No. 65, Bandung, Jawa Barat, 40164

Kewarganegaraan : Indonesia

Jenis Ciptaan : **Karya Ilmiah**

Judul Ciptaan : **Pendekatan In Silico Dalam Pencarian Senyawa Antikanker Dari Teripang**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 1 September 2020, di Bandung

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.

Nomor pencatatan : 000201919

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

LAMPIRAN PENCIPTA

No	Nama	Alamat
1	Dr. Teresa Liliانا Wargasetia, S.Si., M.Kes., PA(K).	Jl. Baladewa Asri II No.38 RT 007 RW 010
2	Dr.dr. Hana Ratnawati, M.Kes.	Jl. Setramurni Tengah IV No.28 Kav.3 RT 001 RW 004
3	Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc.	Jl. Veteran, Malang



Pendekatan *In Silico* dalam Pencarian Senyawa Antikanker dari Teripang

Teresa Liliana Wargasetia¹, Hana Ratnawati¹, Nashi Widodo²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung, Indonesia

²Bagian Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

Pendahuluan

Perkembangan pengetahuan dan teknologi di bidang biologi molekuler yang begitu pesat masih tidak mampu menyelesaikan permasalahan kanker. Masalah utama dalam pengobatan kanker adalah efek samping dan resistensi obat kanker yang diberikan pada pasien. Oleh karena itu, eksplorasi senyawa baru yang berpotensi untuk obat kanker yang aman tanpa efek samping terus-menerus dilakukan.

Teripang (*sea cucumber*) merupakan hewan laut yang telah banyak dimanfaatkan untuk makanan dan obat tradisional, dan tidak ada laporan memiliki toksisitas bagi manusia. Indonesia merupakan penghasil teripang, namun sayangnya kekayaan alam tersebut selama ini hanya diekspor tanpa diolah. Adanya penelitian untuk memformulasikan bahan alam ini sebagai antikanker akan meningkatkan nilai ekonomi teripang Indonesia.

Penelitian di laboratorium untuk mengetahui mekanisme kerja antikanker dari senyawa aktif teripang pada tingkat molekuler telah dilakukan oleh sejumlah peneliti [1-12]. Pendekatan bioinformatik melalui uji *in silico* memungkinkan penelitian potensi senyawa aktif dari teripang sebagai antikanker secara relatif mudah dan murah. Pendekatan *in silico* diharapkan dapat membantu memperpendek perjalanan panjang penelitian sehingga validasi aktivitas senyawa-senyawa yang dipelajari melalui studi *in vivo* dapat segera dilakukan. Penelitian tentang senyawa antikanker dari teripang dengan pendekatan *in silico* sebagai penunjang telah dilakukan baru-baru ini oleh Wargasetia *et al.* (2018), Shahinozzaman *et al.* (2018), Zhang *et al.* (2020), dan Abdelhameed *et al.* (2020) [13-16]. Tulisan ini akan mengulas penelitian-penelitian terkini tersebut untuk memberi gambaran dan inspirasi bagi para peneliti metabolisme kanker di Indonesia terkait pendekatan *in silico* untuk studi senyawa antikanker dari teripang.

Pendekatan *in silico* pada artikel berjudul “Potential use of compounds from sea cucumbers as MDM2 and CXCR4 inhibitors to control cancer cell growth”

Pendekatan *in silico* pada penelitian Wargasetia *et al.* di tahun 2018 yang berjudul “Potential use of compounds from sea cucumbers as MDM2 and CXCR4 inhibitors to control cancer cell growth” dilakukan melalui tahapan:

1. Preparasi struktur molekul dan kode.

Ligan yang digunakan untuk analisis *docking* adalah *colochiroside A*, *ds-echinoside A*, *phillinopside E*, *sphingosine*, *stichoposide C*, *1-(5-chloro-2-methylphenyl)-5-(3-*

chlorophenyl)-2-(3-*m ethylphenyl*)-1*H*-imidazole-4-carboxylic acid, tetra-substituted imidazole (MDM2 inhibitor), dan *chalcone-4* (CXCR4 inhibitor). Ligan-ligan yang digunakan untuk analisis *docking* berupa kode SMILES dari senyawa-senyawa yang dikonversikan ke struktur 3 dimensi dalam format *Protein Data Bank* (PDB) menggunakan *BIOVIA Discovery Studio 4.5*. Struktur 3 dimensi untuk *chalcone-4* diperoleh dari *binding database* (<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>) dan struktur 3 dimensi untuk *substituted imidazole* diperoleh dari PDB (PDB ID, 4OQ3). Struktur reseptor diperoleh dari PDB yaitu MDM2 (PDB ID, 4OQ3) dan CXCR4 (PDB ID, 3OE6). Protein-protein tersebut kemudian dipreparasi menggunakan *BIOVIA Discovery Studio*.

2. Studi *docking* ligan.

Interaksi antara reseptor dan ligan dianalisis dengan *AutoDock Vina* yang terintegrasi dalam *PyRx 0.8* (<https://pyrx.sourceforge.io>) (22,23). Metode *docking* digunakan untuk mengevaluasi afinitas pengikatan dan mengetahui mekanisme molekuler yang melibatkan reseptor dan ligan yang dipelajari. *Docking* dilakukan dengan menetapkan reseptor sebagai molekul yang *rigid*, sedangkan ligan adalah molekul yang fleksibel dalam *active site*. Hasil *docking* dan interaksi pengikatan antara reseptor dan ligan dianalisis dengan *BIOVIA Discovery Studio*.

3. Interaksi dan *networks* antar protein.

Protein-protein yang berinteraksi dengan CXCR4 diidentifikasi menggunakan *BioGRID database* (<https://thebiogrid.org/>), sedangkan interaksi protein-protein dalam *networks* diketahui melalui penggunaan perangkat lunak *STRING* (<https://string-db.org/>).

4. Analisis *pathway*.

Analisis *pathway* (jalur) untuk CXCR4 dilakukan menggunakan *Kyoto Encyclopedia Gene and Genome* (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>). Peran protein CXCR4 dalam berbagai jalur molekuler diidentifikasi menggunakan basis data KEGG *pathways* dan perangkat lunak *STRINGdb 10.5*. Basis data yang digunakan meliputi jalur-jalur molekuler yang digunakan sebagai referensi untuk menentukan fungsi gen atau protein di dalam sel. [13].

Studi oleh Wargasetia *et al.* (2018) menunjukkan bahwa teripang memiliki lebih dari 26 senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker. Analisis *in silico* yang dikerjakan menunjukkan bahwa senyawa *Phalinopside E* dan *Ds-echinoside A* diprediksi mampu menghambat aktivitas protein MDM2 dan CXCR4. Penghambatan aktivitas MDM2 akan memicu apoptosis melalui jalur p53, sedangkan *blocking* terhadap CXCR4 dapat menghambat proliferasi dan pertumbuhan sel kanker melalui dua jalur utama yaitu jalur JAK2/3-STAT dan jalur PTK2 [13].

Pendekatan *in silico* pada artikel berjudul “Cytotoxic desulfated saponin from *Holothuria atra* predicted to have high binding affinity to the oncogenic kinase PAK: a combined *in vitro* and *in silico* study”

Melalui studi simulasi *molecular docking* dan *molecular dynamics*, Shahinozzaman *et al.* (2018) mempelajari sitotoksitas terhadap sel kanker dari suatu *desulfated saponin*

yaitu *desulfated echinoside B* (DEB) yang dipurifikasi dari *Holothuria atra* melalui fraksinasi berdasarkan *bioassay* [14].

Simulasi *molecular docking* dimulai dengan menyiapkan struktur 3 dimensi dari domain katalitik *p21-activated kinase 1* (PAK1) (kode PDB: 3FXZ) yang diunduh dari PDB (<https://www.rcsb.org/>). Protein ini dipreparasi dengan menghilangkan heteroatom melalui Discovery Studio 4.5 (Accelrys, San Diego, CA, USA). Struktur 2 dimensi dari ligan-ligan digambarkan dan dikonversi ke struktur 3 dimensi menggunakan ChemBio3D Ultra 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Optimasi ligan-ligan secara penuh dilakukan melalui Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA) menggunakan metode semi empiris PM6. Ligan-ligan disimpan dalam bentuk format PDB dan akan digunakan sebagai *input file* untuk simulasi *molecular docking* menggunakan *AutoDock Vina* (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Perangkat lunak ini adalah *open source program* yang digunakan secara luas untuk simulasi *molecular docking* yang secara signifikan mempunyai akurasi prediksi pengikatan lebih baik dibandingkan dengan AutoDock 4. Ukuran *grid box* diatur hingga maksimum agar mencakup semua domain katalitik PAK1, dan dimensi dari *grid box* adalah 52,06, 59,09, and 44,73 Å untuk aksis x, y, dan z. Posisi pengikatan dengan afinitas pengikatan terendah dipilih sebagai posisi terbaik untuk ligan terkait. Interaksi antara protein dan ligan divisualisasikan dan dianalisis dengan *PyMol* (Schrödinger, Inc., New York, NY, USA) dan *Discovery Studio 4.5* (Accelrys, San Diego, CA, USA) [14].

Simulasi *molecular dynamics* dilakukan pada DEB dan Frondoside A (FRA) yang telah di-*docking* menggunakan medan gaya AMBER14 dalam YASARA *dynamics suite*. Sistem *molecular dynamics* dinetralisasi dengan penambahan 0,9% NaCl dengan PH 7,4. Suhu untuk simulasi adalah 298 K. *Transferable intermolecular potential3 points (TIP3P) water model* dipakai dan total molekul air adalah 4.729 dengan densitas 1,012 gm/cm³. Kondisi pembatasan secara periodik digunakan selama simulasi dengan ukuran boks adalah 80,5 × 80,5 × 80,5 Å³. Proses meminimalkan energi awal dari setiap sistem simulasi dilaksanakan dengan *simulated annealing method*, menggunakan pendekatan gradien yang paling berbeda (5.000 siklus). Untuk mengukur interaksi elektrostatik dengan kisaran yang lebar digunakan pendekatan particle-mesh Ewald. Untuk kisaran sempit pada interaksi *van der Waals* dan *Coulomb*, digunakan *cut-off* untuk radius sebesar 8.0 Å. Algoritma *multiple time step* bersama *simulation time step interval* sebesar 2,50 fs digunakan. Pada tekanan konstan 1 bar dan suhu 298 K menggunakan termostat Berendsen, proses dilaksanakan selama for 20 ns ketika *trajectories* disimpan setiap 100 ps. *Molecular dynamics trajectories* dianalisis dengan program makro yang ditulis dalam bahasa YANACONDA. Saat analisis dikoleksi informasi waktu, energi, jarak ikatan, sudut ikatan, sudut dihedral, interaksi *van der Waals* dan *Columb* dan nilai *root mean square deviation* (RMSD) untuk tulang punggung, karbon alfa, dan atom-atom besar. Untuk mendeteksi nilai afinitas pengikatan setelah simulasi *molecular dynamics* 20 ns, ligan-ligan diekstraksi dari kompleks yang disimulasikan dan dilakukan *docking* ulang terhadap reseptor terkait menggunakan *AutoDock Vina* (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) [14].

Melalui studi simulasi *molecular docking* oleh Shahinozzaman *et al.* (2018) diketahui bahwa DEB terikat erat dengan domain katalitik PAK1 dan menunjukkan energi pengikatan -8,2 kkal/mol yang lebih kecil bila dibandingkan dengan energi pengikatan -7,7 kkal/mol untuk FRA. Keduanya berikatan pada daerah pengikatan alosterik baru yang terletak dekat

lokasi pengikatan ATP. Simulasi *molecular dynamics* memperlihatkan bahwa DEB dapat membentuk kompleks yang lebih stabil dengan PAK1, berada pada daerah pengikatan alosterik, dan membentuk ikatan hidrogen dengan residu sekitarnya dengan jumlah maksimum. Residu pengikat ligan ditemukan berfluktuasi lebih sedikit pada kompleks DEB-PAK1 dibandingkan kompleks FRA-PAK1 saat simulasi *molecular dynamics* dilakukan. Studi *in silico* dengan menggunakan komputer mendukung hasil eksperimental laboratorium bahwa DEB dan FRA berperan sebagai inhibitor PAK1 dan peran DEB sebagai inhibitor PAK1 lebih menjanjikan daripada FRA[14].

Pendekatan *in silico* pada artikel berjudul “Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: In vitro activity, de novo sequencing, and in silico docking for in vivo function prediction”

Zhang et al. di tahun 2020 melaporkan hasil penelitian tentang prediksi fungsi antioksidan peptida-peptida dari teripang dengan pendekatan metode *in vitro*, sekuensing *de novo*, dan *docking*. Asam amino kunci untuk antioksidan yaitu Cys, His, Met, Trp dan Tyr pada sejumlah peptida dan interaksi molekuler antara peptida-peptida dengan enzim *myeloperoxidase* (MPO), suatu mediator dan petanda stres oksidatif *in vivo*, dianalisis dengan metode *in silico* [15].

Sekuens peptida yang diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS dianalisis menggunakan laman untuk analisis sekuens peptida yaitu *ExpASY ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Komposisi asam amino dan skor *grand average of hydropathy* (GRAVY) untuk setiap sekuens peptida dikoleksi. Nilai GRAVY yang lebih besar mengindikasikan hidrofobisitas peptida yang tinggi. Selanjutnya dilakukan *molecular docking* peptida terhadap enzim MPO. Enzim MPO pada manusia (PDB ID: 3F9P) digunakan sebagai reseptor untuk *molecular docking* dengan setiap peptida/ligan hasil identifikasi dengan LC-MS/MS. *Docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio* (Accelrys, San Diego, CA, USA). Struktur 3 dimensi MPO dioptimasi menggunakan *Prepare Protein program* untuk meminimalkan energi, protonisasi, dan menghilangkan molekul-molekul air. *CDOCKER docking program*, menggunakan *simulated-annealing-based algorithm*, digunakan untuk menentukan interaksi antara peptida dan enzim MPO. Pengaturan parameter berdasarkan studi sebelumnya dan peptida LF1- 11 (GRRRRSVQWCA) yang diturunkan dari ujung N human lactoferrin penghambat MPO digunakan sebagai referensi untuk memilih sekuens-sekuens peptida yang menghambat MPO [15].

Pada analisis *in silico* dipilih sejumlah peptida dengan nilai *CDOCKER* yang tinggi. Peptida dengan interaksi molekuler yang kuat dengan sisi aktif enzim MPO, termasuk van der Waals, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan elektrostatis diprediksi menghambat MPO yang menandakan peptida-peptida tersebut bersifat antioksidan secara *in vivo*[15].

Pendekatan *in silico* pada artikel berjudul “New cytotoxic cerebroside from the red sea cucumber *Holothuria spinifera* supported by in-silico studies”

Abdelhameed et al. (2020) mempelajari sifat antikanker senyawa *cerebroside* dari *Holothuria spinifera* dengan bantuan studi *molecular docking*. Struktur kristalografi dari protein SET, suatu inhibitor protein *phosphatase 2A* (PP2A), beserta ligannya diperoleh dari

PDB. Proses pengaturan struktur dilakukan untuk memperbaiki *protein errors* sebagai tambahan terhadap pembuatan struktur protein yang diatur berdasarkan aturan standar MOE (*Molecular Operating Environment*). Penghilangan molekul-molekul air dan ligan-ligan yang tidak terlibat dalam pengikatan dilakukan menggunakan *quick preparation protocol* untuk preparasi protein. Metode Gasteiger diaplikasikan untuk menghitung muatan parsial dari protein. Studi *molecular docking* dilaksanakan menggunakan perangkat lunak *Molecular Operating Environment 2019.0101 software*. Koordinat ligan dari senyawa-senyawa dibuat dengan *ChemDraw Ultra 11.0*. Protonasi senyawa, koreksi atom, dan tipe pengikatan ditentukan; atom-atom hidrogen ditambahkan; protonasi dan minimalisasi akhir dilakukan (AMBER10, *gradient*: 0.01). Eksperimen *docking* pada gen dari protein SET dilakukan dengan *redocking* ligan dengan PDB file 2E50 setelah ligan dihilangkan. Metode *Triangle Matcher placement* dipilih untuk *docking*. GBVI/WSA dG *scoring function* yang menentukan energi bebas dari pengikatan ligan dari posisi awal dipilih untuk menentukan peringkat posisi final. Kompleks ligan dengan protein yang mempunyai *S-score* terendah dipilih. *Redocking* ligan dengan targetnya menghasilkan RMSD (*root mean square deviation*) 0.606 Å, yang mengonfirmasi bahwa ligan berikatan dengan daerah yang sama dan memastikan parameter-parameter *docking* dapat dipercaya [16].

Pada studi *docking* yang dilakukan oleh Abdelhameed *et al.* dipelajari empat senyawa dari teripang untuk melihat interaksi pengikatan senyawa-senyawa tersebut dengan *active site* dari protein SET, suatu inhibitor protein PP2A. Interaksi tersebut menjelaskan adanya aktivitas sitotoksik dari senyawa-senyawa yang dipelajari. Dari pustaka diketahui bahwa onkoprotein SET berperan dalam perkembangan kanker melalui inhibisi protein penekan tumor PP2A. Pengikatan langsung *ceramide* dengan protein SET diduga akan berkontribusi terhadap aktivasi PP2A. *Ceramide* terdapat dalam senyawa *cerebroside*. Oleh karena itu inhibisi SET sebagai target oleh senyawa-senyawa *cerebroside* diharapkan akan berperan efektif dalam menghambat proliferasi sel kanker [16].

Penutup

Pendekatan bioinformatik melalui uji *in silico* memungkinkan penelitian potensi antikanker dari senyawa aktif teripang secara relatif mudah dan murah. Melalui pendekatan tersebut, peran senyawa aktif sebagai stimulator gen penekan tumor atau inhibitor onkogen yang berperan dalam inisiasi dan progresi kanker dapat diperkirakan. Penelitian dengan pendekatan *in silico* sesuai dengan kondisi di Indonesia dengan keterbatasan dana, peralatan, dan sumberdaya. Oleh karena itu pendekatan *in silico* dalam penelitian pemanfaatan senyawa aktif teripang sebagai antikanker merupakan suatu pilihan yang baik untuk mengarahkan penelitian menuju validasi secara *in vivo*.

Referensi

1. Tong Y, Zhang X, Tian F, Yi Y, Xu Q, Li L, Tong L, Lin L, Ding J. Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *Int J Cancer*. 2005;114:843–853. doi:10.1002/ijc.20804.
2. Careaga VP, Bueno C, Muniain C, Alché L, Maier MS. Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a triterpene glycoside from *Psolus patagonicus* and its desulfated analog. *Chemotherapy*. 2009 (55):60–68. doi:10.1159/000180340.

3. Nguyen BCQ, Yoshimura K, Kumazawa S, Tawata S, Maruta H. Frondoside A from sea cucumber and nymphaeols from Okinawa propolis: Natural anti-cancer agents that selectively inhibit PAK1 in vitro. *Drug Discov Ther.* 2017;11:110–114. doi:10.5582/ddt.2017.01011.
4. Dyshlovoy SA, Madanchi R, Hauschild J, Otte Z, Alsdorf WH, Schumacher U, Kalinin VI, Silchenko AS, Avilov SA *et al.* The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2017;17(93). doi:10.1186/s12885-017-3085-z.
5. Aminin DL, Menchinskaya ES, Pislyagin EA, Silchenko AS, Avilov SA, Kalinin VI. Sea cucumber triterpene glycosides as anticancer agents. *Stud Nat Prod Chem.* 2016;49:55–105. doi:10.1016/B978-0-444-63601-0.00002-8.
6. Yu S, Ye X, Huang H, Peng R, Su Z, Lian XY, Zhang Z. Bioactive sulfated saponins from sea cucumber *Holothuria moebii*. *Planta Med.* 2015;81:152–159. doi:10.1055/s-0034-1383404.
7. Silchenko AS, Kalinovskiy AI, Avilov SA, Kalinin VI, Andrijaschenko PV, Dmitrenok PS, Chingizova EA, Ermakova SP, Malyarenko OS, Dautova TN. Nine new triterpene glycosides, magnumosides A1–A4, B1, B2, C1, C2 and C4, from the Vietnamese sea cucumber *Neothyronidium (=Massinium) magnum*: structures and activities against tumor cells independently and in synergy with radioactive irradiation. *Mar Drugs.* 2017;15(256). doi:10.3390/md15080256.
8. Zhang JJ, Zhu KQ. A novel antitumor compound nobilicide D isolated from sea cucumber (*Holothuria nobilis Selenka*). *Exp. Ther. Med.* 2017;14:1653–1658. doi:10.3892/etm.2017.4656.
9. Cuong NX, Vien LT, Hoang L, Hanh TTH, Thao DT, Thanh NV, Nam NH, Thung DC, Kiem PV, Minh CV. Cytotoxic triterpene diglycosides from the sea cucumber *Stichopus horrens*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017;27:2939–2942. doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.003.
10. Omran NE, Khedr AM. Structure elucidation, protein profile and the antitumor effect of the biological active substance extracted from sea cucumber *Holothuria polii*. *Toxicol Ind Health.* 2015;31:1–8. doi:10.1177/0748233712466135.
11. Zhang Y, Yi Y. Studies on antitumor activities of triterpene glycoside colochiroside A from sea cucumber *Colochirus anceps*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi. China J Chin Mater Medica.* 2011;36:504–507.
12. Han H, Xu QZ, Tang HF, Yi YH, Gong W. Cytotoxic holostane-type triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis*. *Planta Med.* 2010;76:1900–1904. doi:10.1055/s-0030-1249854.
13. Wargasetia TL, Permana S, Widodo. Potential use of compounds from sea cucumbers as MDM2 and CXCR4 inhibitors to control cancer cell growth. *Exp Ther Med.* 2018; 16:2985-2991. doi:10.3892/etm.2018.6588.
14. Shahinozzaman M, Ishii T, Takano R, Halim MA, Hossain MA, Tawata S. Cytotoxic desulfated saponin from *Holothuria atra* predicted to have high binding affinity to the oncogenic kinase PAK: a combined in vitro and in silico study. *Sci Pharm.* 2018;86(32). doi:10.3390/scipharm86030032.
15. Zhang Y, He S, Bonneil É, Simpson BK. Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: In vitro activity, de novo sequencing, and in silico docking for in vivo function prediction. *Food Chem.* 2020;306:125581. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125581.
16. Abdelhameed RFA, Eltamany EE, Hal DM, Ibrahim AK, AboulMagd AM, Al-Warhi T, Youssif KA, Abd El-kader AM, Hassanean HA, Fayez S, Bringmann G, Ahmed SA, Abdelmohsen UR. New cytotoxic cerebroside from the red sea cucumber *Holothuria spinifera* supported by in-silico studies. *Mar Drugs.* 2020, 18,405; doi:10.3390/md18080405.