



Konstruksi dan Validasi Protokol Skrining Virtual Berbasis Struktur dengan Kode PDB 3MQE, 3NTG, dan 3LN0 untuk Penemuan Inhibitor Siklooksigenase-2 (COX-2)

(Construction and Validation of Virtual Screening Based on Code Structure of PDB3MQE, 3NTG, and 3LN0 To Discover Cyclooxygenase Inhibitor-2 (COX-2))

ESTI MUMPUNI^{1*}, ARGUN WIDARSA¹, YANTI SUSILAWATI¹, OISAN¹,
ARIEF NURROCHMAD², HARNO DWI PRANOWO², UMAR ANGGARA JENIE²,
ENADE PERDANA ISTYASTONO³

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jakarta 12640.

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta 55281.

³Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

Diterima 19 Februari 2014, Disetujui 3 Maret 2014

Abstrak: Seiring dengan tingginya penggunaan obat inhibitor COX-2 di pasaran serta efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obat yang beredar saat ini maka penemuan obat inhibitor COX-2 baru dibutuhkan untuk mencari obat yang selektif terhadap COX-2 dan memberikan efek samping yang minimal. Salah satu metode yang efektif dan efisien untuk penemuan obat baru yaitu *in silico*. Telah dilakukan penelitian konstruksi dan validasi protokol skrining virtual berbasis struktur dengan kode protein PDB 3NTG, 3MQE dan 3LN0 menggunakan perangkat lunak PLANTS, SPORES, BKChem dan Open Babel untuk penemuan inhibitor COX-2 baru. Dalam penelitian ini digunakan dataset ligan-ligan aktif COX-2 dan pengecohnya (*decoy*) dari *The directory of useful decoys* (DUD) untuk validasi retrospektif protokol, yang terdiri dari 426 inhibitor COX-2 dan 13289 *decoy*. Berdasarkan kriteria nilai EF20% dan EFmax dalam artikel Huang *et al* (2006) dan Yuniarti *et al* (2011) dihasilkan dua protokol menunjukkan hasil yang sangat baik dan baik yaitu protokol tervalidasi AYO_COX2_v.1.1 dan AYO_COX2_v.1.2

Kata kunci: protokol, skrining virtual, inhibitor, COX-2.

Abstract: Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors are high demand drugs in the market. However, available COX-2 inhibitors nowadays have many side effects. Therefore, there is still a need to develop more potent selective COX-2 inhibitors and one of the method that has been prove the effectivity and efficiency for new drugs research is *in silico*. Structure-based virtual screening (SBVS) protocols were developed to find COX-2 inhibitors using the Protein-Ligand ANT System (PLANTS) docking software, SPORES, BKChem and Open Babel. The directory of useful decoys (DUD) dataset for COX-2 was used to validate the protocols retrospectively; the DUD consist of 426 known COX-2 inhibitors and 13289 decoys. Based on criteria value of EF20% and EFmax used in the article from Huang *et al* (2006) and Yuniarti *et al* (2011), two validated protocol, AYO_COX2_v.1.1 and AYO_COX2_v.1.2, showed good results

Keywords: protocols, virtual screening, inhibitor, COX-2.

* Penulis korespondensi, Hp. 08151663201
e-mail: esti_mumpuni@yahoo.com



PENDAHULUAN

PERANAN enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dalam proses inflamasi sudah terbukti penting dan beberapa obat selektif yang menargetkan enzim ini telah mampu meraih dan menembus pasar dengan sukses^(1,2). Selain itu, hubungan antara enzim COX-2 dan kanker telah banyak diteliti dan diajukan^(1,3). Oleh karena itu, menjadikan enzim ini sebagai target merupakan strategi penemuan obat yang tepat dan patut dilakukan. Di sisi lain, dataset yang terdiri dari senyawa aktif inhibitor COX-2 dan *decoys*-nya telah tersedia secara publik dalam *a directory of useful decoys* (DUD) (<http://dud.docking.org/r2/cox2.tar.gz>)⁽⁴⁾. Dataset tersebut dapat digunakan untuk melakukan validasi secara retrospektif dan obyektif dengan menilai protokol skrining virtual berbasis struktur (*structure-based virtual screening* (SBVS)) yang dikembangkan untuk kebutuhan akan protokol yang valid untuk identifikasi ligan COX-2 dan elusidasi pose ikatan ligan-ligan tersebut pada kantung ikatan COX-2. Enzim COX-2 dianggap sebagai target yang menantang dalam membangun protokol SBVS. Upaya pertama yang menggunakan dataset ini menghasilkan nilai faktor pengayaan (*enrichment factor* (EF)) maksimum (EF_{max}) dan faktor pengayaan dari 20% database (EF₂₀) masing-masing sebesar 29,1 dan 3,3⁽⁴⁾. Hasil ini dianggap baik, namun masih memberikan peluang untuk dapat ditingkatkan lagi kualitasnya^(4,5).

Simulasi *docking* molekul sering digunakan sebagai tulang punggung dalam protokol SBVS^(6,7). Oleh karena itu, perkembangan dan keterbatasan dari simulasi *docking* molekul dapat memberikan dampak yang signifikan terhadap kualitas dari suatu protokol SBVS. Pada umumnya, langkah dari konstruksi protokol SBVS terdiri dari preparasi ligan, simulasi *docking* molekul, analisis dan visualisasi hasil. *Docking* molekul itu sendiri terdiri atas preparasi molekul target dan konfigurasi simulasi⁽⁷⁻⁹⁾.

Beberapa penelitian telah dilakukan seperti pengembangan protokol SBVS dengan menggunakan struktur kristal 1CX2⁽⁴⁾ dan 6COX⁽¹¹⁾. Kedua struktur tersebut terikat pada ligan yang sama yaitu pada inhibitor selektif COX-2 (1-phenylsulfonamide-3-trifluoromethyl-5-parabromophenyl-pirazol (SC-558)) serta ditujukan untuk penemuan inhibitor selektif COX-2. Selain itu, telah dilakukan juga pengembangan protokol tervalidasi dengan strategi memasukkan pentingnya interaksi antara ARG513 sebagai “jangkar” ikatan hidrogen dengan inhibitor COX-2 yang terbukti dapat meningkatkan kualitas dari virtual skriningnya dalam menemukan inhibitor COX-2⁽⁵⁾. Pengembangan protokol SBVS untuk menemukan inhibitor COX-2 telah dimulai sejak tahun 2010 dengan menggunakan

aplikasi *docking* PLANTS sebagai aplikasi simulasi *docking* molekuler. Preparasi ligan dilakukan dengan menggunakan paket *software* MarvinSketch dari ChemAxon dan analisis serta visualisasi hasil *docking* masing-masing dilakukan dengan menggunakan *software* statistik R dan PyMOL⁽¹⁰⁾.

Baru-baru ini telah dipublikasikan beberapa struktur kristal baru dari COX-2 yaitu struktur kristal dengan kode 3LN0, 3MQE, dan 3NTG dari <http://www.pdb.org/> yang masing-masing terikat pada ligan yang berbeda. Ketiga struktur tersebut memiliki beberapa kelebihan, salah satunya yaitu memiliki resolusi yang lebih kecil (kode PDB 3LN0 : 2,10 Å, 3MQE : 2,80 Å, dan 3NTG : 2,19 Å) dibandingkan struktur dengan kode 1CX2 (3,00 Å) dan 6COX (2,80 Å) kecuali untuk kode 3MQE memiliki resolusi yang sama dengan 6COX. Hal ini menunjukkan bahwa ketiganya memiliki kemampuan mengikat ligan yang lebih baik dan dapat dijadikan sebagai struktur target dalam pengembangan protokol SBVS baru yang dapat digunakan untuk menemukan inhibitor COX-2.

Pada penelitian ini dilakukan konstruksi dan validasi protokol SBVS baru untuk menemukan senyawa inhibitor COX-2 serta peningkatan kualitas dari protokol tervalidasi. Dalam hal ini digunakan sumber-sumber yang tersedia secara publik yang terdiri dari *software-software* gratis dan dataset yang memiliki lisensi akademik atau lisensi publik. *Software docking* yang dipilih adalah PLANTS karena *software* tersebut dapat diperoleh secara gratis dengan lisensi akademik dan juga menawarkan banyak pilihan konfigurasi yang memungkinkan serta mudah dilakukan (cukup *single line command* untuk simulasi). PLANTS merupakan aplikasi *docking* yang telah di-*benchmark* secara internal di grup penelitian Kimia Medisinal, Vrije Universiteit Amsterdam dengan GOLD (aplikasi *docking* berbayar)⁽¹⁰⁾. Konstruksi diawali dengan menetapkan struktur target. Setelah struktur target ditetapkan dilanjutkan dengan preparasi menggunakan SPORES yang merupakan *software* yang dikembangkan untuk digunakan bersama PLANTS dalam preparasi ligan dan protein, PyMOL untuk visualisasi, *Open Babel* untuk konversi tipe file serta MarvinSketch untuk menggambarkan struktur molekul. Protokol SBVS yang telah dibangun baru dapat digunakan setelah diketahui validitasnya^(5,8). Dalam hal ini, validasi dasar yang harus dilakukan adalah dengan melihat kemampuan protokol untuk mereproduksi pose ligan ko-kristal di dalam protein target (COX-2). Secara obyektif, kemampuan mereproduksi ini dilihat dari nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) antara pose ligan hasil *docking* dengan pose ligan pada kristal struktur yang dihitung dan divisualisasikan

dengan menggunakan PyMOL. Apabila diketahui bahwa protokol tersebut mampu mereproduksi pose ligan ko-kristal di dalam protein target (COX-2), kemudian akan dilihat kemampuannya dalam hal mengidentifikasi senyawa inhibitor COX-2 secara retrospektif.

Setelah protokol SBVS tervalidasi, protokol tersebut dapat digunakan lebih lanjut untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai inhibitor selektif COX-2 untuk melihat posisi senyawa-senyawa tersebut di jajaran senyawa-senyawa yang sudah diketahui aktivitasnya sebagai inhibitor selektif COX-2.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Struktur kristal protein target: Struktur kristal molekul siklooksigenase-2 (COX-2): 3MQE, 3NTG dan 3LNO yang diunduh dari PDB (*Protein Data Bank*) *website*: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3mqe/3ntg/3ln0>. Senyawa untuk validasi retrospektif sejumlah 426 senyawa aktif dalam 13289 *decoys* diunduh dari DUD, *website*: <http://dud.docking.org/r2/>.

Perangkat keras: Satu set komputer dengan prosesor Intel Pentium Core2Duo™ E4500 2.53 Ghz, RAM 1 Gb, VGA 64 Mb *onboard*. Perangkat lunak yang digunakan: Sistem operasi Linux Ubuntu 10.04 LTS – *the lucid lynx*, SPORES dan PLANTS 1.1 Versions for LINUX *website*: <http://www.tcd.uni-konstanz.de/index.php>, BKchem0.13.0 *website*: <http://www.bkchem.zirael.org/index.html>, PyMOL 1.2r1 *website*: <http://www.pymol.org/>, *Open Babel Version 2.3.0 website*: <http://openbabel.org/>

METODE. Preparasi Target Virtual Protokol Dengan SPORES. Pada jendela Ubuntu dipilih aplikasi menuju terminal untuk membuat direktori kerja, diunduh dan ekstrak struktur kristal protein (kode PDB 3MQE, 3NTG, 3LNO), preparasi target-virtual dengan SPORES. Preparasi target-virtual dilakukan sebanyak 1000 kali

Konfigurasi *docking* disiapkan (mengacu pada jurnal Nunung Yuniarti *et al.* 2011)⁽⁵⁾ dengan membuat *file plantsconfig.txt*, masuk ke direktori target-virtual, kopi *file config.txt* dari direktori induk, sesuaikan *file config.txt* dengan hasil *running* SPORES.

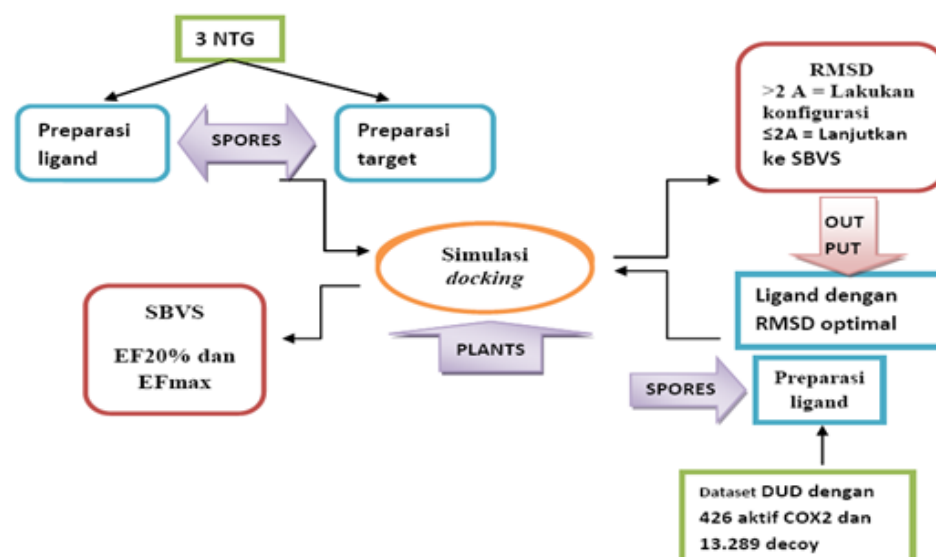
Validasi Internal Berdasarkan RMSD. Pada direktori target-virtual dilakukan preparasi ligan pembanding untuk dilakukan *re-dock* (ligan pembanding dengan konformasi yang memiliki energi terendah). Perhitungan RMSD dilakukan konversi *file* baik ligan pembanding dalam geometri aslinya dari mol2 ke pdb, setelah itu dikonversi hasil *docking* dari mol2 ke pdb, dilakukan perhitungan RMSD

pada target-virtual_0001 sampai target-virtual_1000. Setelah langkah ini selesai, dari 1000 kali pengulangan tersebut dipilih protokol dengan nilai RMSD yang paling optimal untuk dilanjutkan dengan validasi retrospektif. Sebuah protokol diterima bila RMSD *heavy atoms* hasil *docking* dibandingkan dengan referensinya kurang dari 2,0 Å.

Validasi Retrospektif. Validasi dimulai dengan membuat direktori kerja, direktori ligan, dan direktori *decoys*. *Docking* senyawa pembanding diunduh dan diekstrak dari DUD dengan menggunakan PLANTS dengan cara pengkopian protein mol2 dan *file config* dari protokol teroptimasi yang diperoleh dari langkah validasi berdasarkan RMSD, penyesuaian *file config*, *running* simulasi *docking*, memasuki direktori *decoys*, ekstrak input *file decoys*, dan penyesuaian nama ligan pada *file cox_ligands.mol2*. Hasil *docking* ligan dan *decoys* dikombinasikan, dan dilakukan *ranking* berdasarkan *score* PLANTS Chemplp dan dihitung nilai EF_{max} dan $EF_{20\%}$. Jika nilai EF_{max} diperoleh diatas 30/ ≥ 30 maka berdasarkan hasil eksperimen Huang *et al*⁽⁴⁾ dikategorikan sangat baik, sedangkan nilai 20-30 dikategorikan baik. Jika nilai $EF_{20\%}$ diperoleh diatas 3/ ≥ 3 maka berdasarkan hasil eksperimen Huang *et al*⁽⁴⁾, dikategorikan sangat baik, dan nilai 2,5-3 dikategorikan baik. Dari protokol optimal yang didapat dipilih satu senyawa yang mewakili sebagai senyawa pembanding (yang memiliki *phi value* tertinggi). Secara garis besar skema konstruksi dan validasi protokol SBVS diilustrasikan seperti Gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan Analisis Preparasi Target Virtual. Langkah awal konstruksi protokol SBVS adalah mempersiapkan target virtual yang merupakan struktur hasil kristalografi yang tersimpan di basis data PDB. Data makromolekul yang pada umumnya berupa protein diperoleh dengan mengakses situs www.pdb.org. PDB adalah basis data tunggal yang menyimpan model struktural tiga dimensi protein dan asam nukleat hasil penentuan eksperimental (dengan kristalografi sinar-X, spektroskopi NMR dan mikroskopi elektron). PDB menyimpan data struktur sebagai koordinat tiga dimensi yang menggambarkan posisi atom-atom dalam protein ataupun asam nukleat. Terdapat 2 kriteria mengenai protein yaitu protein yang telah terdapat dalam bentuk *crystal structure* dan protein yang masih dalam bentuk *theoretical structure*. Protein dalam bentuk *crystal structure* telah melalui proses validasi secara eksperimental baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* sedangkan *theoretical structure* belum melalui proses validasi yang baik.



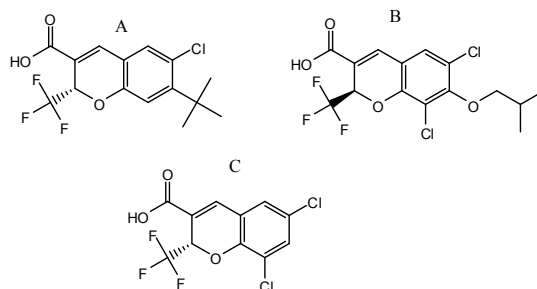
Gambar 1. Skema konstruksi dan validasi protokol SBVS menggunakan ChemAxon, SPORES, PLANTS. Hasil analisis didasarkan pada nilai root mean square deviation (RMSD) yang dihitung dengan menggunakan SPORES atau PyMOL. Semua simulasi dan kalkulasi secara komputasi dilakukan dalam distribusi Ubuntu, sistem operasi berbasis Linux.

Dalam penelitian target virtual untuk penapisan virtual guna identifikasi senyawa inhibitor enzim COX-2 digunakan kristal struktur COX-2 dengan kode PDB dan resolusinya 3MQE (2,80 Å), 3NTG (2,19 Å), dan 3LN0 (2,20 Å), semakin tinggi resolusi makin semakin baik kristal struktur tersebut⁽⁴⁾. Kristal struktur tersebut dipilih sebagai target virtual karena struktur tersebut relatif baru dan memiliki resolusi yang dapat diterima sebagai target virtual.

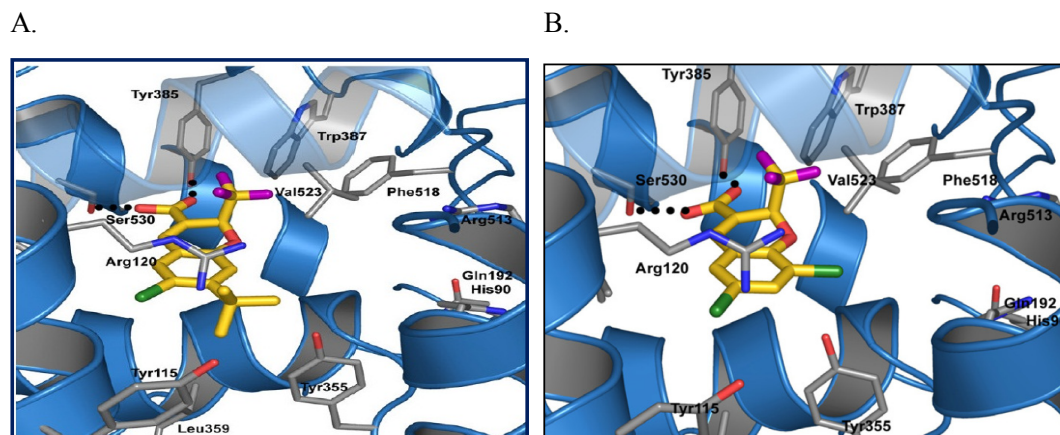
Kristal struktur yang telah diunduh kemudian dipisahkan ligan dan protein virtualnya dengan menggunakan SPORES. Luaran yang diperoleh yakni berkas protein.mol2 dan ligan ko-kristal dimana berkas protein.mol2 digunakan sebagai target virtual sedangkan untuk memilih berkas ligan ko-kristal sebagai referensi untuk menentukan lokasi aktif, dipelajari dari Kuvareva *et al*⁽¹⁰⁾ dan situs PDB. Gambar 2 adalah ligan ko-kristal masing-masing protein COX-2.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan pentingnya interaksi antara inhibitor COX-2 dan ARG513 dimana interaksi antara inhibitor COX-2 dan ARG513 dapat meningkatkan kualitas skrining virtual⁽⁵⁾. Mengacu hal tersebut pentingnya dipelajari interaksi kristal struktur yang digunakan (kode PDB 3MQE) dengan SER530 dan TYR385, juga interaksi sisi aktif kristal struktur COX-2 dengan kode PDB 3LN0 dengan SER530 seperti terlihat pada Gambar 3.

Hasil Validasi Target Virtual Berbasis RMSD (Konfigurasi Standar / Default Setting). Proses selanjutnya dalam konstruksi protokol SBVS adalah optimasi preparasi ligan referensi dan protein target menggunakan SPORES dan secara simultan melakukan validasi dasar simulasi *docking*. Validasi dasar dan standar dari simulasi *docking* molekul dilakukan dengan melihat kemampuan simulasi untuk mereproduksi pose ligan ko-kristal dalam protein target. Fungsi objektif yang umumnya digunakan



Gambar 2. A. Senyawa (2S)-7-tert-butyl-6-chloro-2-(trifluoromethyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (ligan ko-kristal 3MQE). B. Senyawa (2R)-6,8-dichloro-7-(2-methylpropoxy)-2-(trifluoromethyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (ligan ko-kristal 3NTG). C. Senyawa (2S)-6,8-dichloro-2-(trifluoromethyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (ligan ko-kristal 3LN0).



Gambar 3. A. Interaksi sisi aktif kristal struktur COX-2 dengan kode PDB 3MQE dengan SER530 dan TYR38. B. Interaksi sisi aktif kristal struktur COX-2 dengan kode PDB 3LN0 dengan SER530.

untuk menilai kemampuan ini adalah RMSD. RMSD menggambarkan penyimpangan (deviasi) jarak pose hasil *docking* dibandingkan dengan pose 3D dari ligan target (struktur kode PDB) yang dihitung dan divisualisasikan dengan menggunakan PyMOL. Dengan algoritma SPORES yang bersifat stokastik yang non-deterministik memungkinkan diperoleh konformasi protein target yang berbeda-beda sehingga dapat dioptimasi dan hasilnya dievaluasi berdasarkan nilai RMSD-nya. Pada proses ini dilakukan optimasi dengan pengulangan (iterasi) sebanyak 1000 kali yang memungkinkan untuk memperoleh nilai RMSD sekecil mungkin. Semakin banyak pengulangan semakin mungkin diperoleh nilai RMSD paling minimal. Untuk menjalankan proses tersebut dilakukan secara otomatis dengan bantuan *shell script* untuk optimasi yang telah diunduh dari situs molmod.org. Untuk mendapatkan suatu protokol SBVS yang valid, simulasi *docking* harus menghasilkan nilai RMSD kurang atau sama dengan 2,0. Dari ketiga kode PDB tersebut terbukti jika semakin tinggi nilai resolusinya semakin besar ruang untuk mereproduksi pose dan struktur ligan ko-kristal. Protokol *default* merupakan protokol dengan pengaturan umum tanpa penambahan nilai lebih bila ada interaksi antara Ho (hidrogen) dengan suatu asam amino⁽⁴⁾. Dari hasil 1000 kali iterasi untuk 3MQE diperoleh nilai maksimal RMSD dari 4,970 Å hingga nilai minimal 4,863 Å. Hal ini menunjukkan bahwa benar algoritma yang digunakan tidak deterministik dan terdapat banyaknya kemungkinan pose ikatan senyawa ko-kristal dalam loka aktif COX-2.

Tabel 1. Hasil validasi internal RMSD

Kode PDB enzim COX-2	Nilai RMSD Protokol Default
3MQE	4,86 Å
3NTG	0,909 Å
3LN0	1,06 Å

Tabel 1 menjelaskan bahwa ligan ko-kristal hasil *docking* molekul menduduki loka aktif yang berbeda dengan ligan ko-kristal dari struktur 3MQE. Hal ini dikarenakan loka aktif dari struktur protein COX-2 (kode PDB 3MQE) relatif luas sehingga menyebabkan ligan ko-kristal hasil *docking* molekul mempunyai peluang untuk menduduki bagian-bagian loka aktif yang berbeda dari ligan ko-kristal struktur COX-2 (kode PDB 3MQE). Hal ini menunjukkan bahwa protokol tersebut tidak mampu mendudukan sebuah inhibitor COX-2 (dalam hal ini senyawa ko-kristal) pada loka aktif COX-2 dengan akurat. Oleh karena itu protokol tersebut dapat dikatakan tidak valid berdasarkan RMSD ($\text{RMSD} = 4,863 \text{ \AA} > 2,0 \text{ \AA}$) dan tidak dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu validasi protokol secara retrospektif karena selain untuk memilah senyawa aktif dari *decoy* juga protokol akan dipakai untuk elusidasi senyawa yang terbukti aktif sehingga perlu $\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$. Nilai minimal RMSD untuk kristal struktur COX-2 kode PDB 3NTG dan 3LN0 dibawah $2 \text{ \AA} / < 2,0 \text{ \AA}$, maka dinyatakan valid dan dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu validasi protokol secara retrospektif.

Analisis dan Hasil Validasi Retrospektif Protokol SBVS. Terkait dengan tujuan penelitian yakni untuk menciptakan dan memvalidasi suatu protokol skrining virtual berbasis struktur (SBVS) dengan menggunakan kode PDB 3MQE, 3NTG dan 3LN0 sebagai struktur target yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa inhibitor siklooksigenase-2 (COX-2), maka validasi retrospektif protokol untuk melihat kemampuan protokol SBVS sangat dianjurkan untuk meningkatkan kualitas dalam penerapan protokol prospektif tersebut. Ketersediaan *dataset* yang terdiri dari inhibitor COX-2 aktif dan *decoy*-nya memungkinkan peneliti untuk melakukan validasi ini. Validasi secara retrospektif dilakukan terhadap protokol optimasi yang telah valid berdasarkan nilai

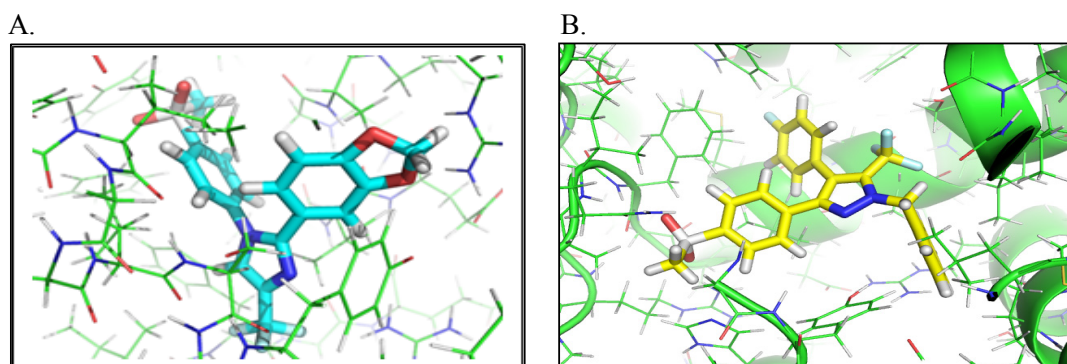
Tabel 2. Hasil validasi retrospektif.

3NTG	3LN0
EF ₂₀ : 3,02	EF ₂₀ : 2,7
EF _{max} : ~ (tak terhingga)	EF _{max} : 3,2

RMSD-nya. Tabel 2 adalah hasil validasi protokol SBVS secara retrospektif.

Berdasarkan Tabel 2, nilai EF_{20%} dan EF_{max} menurut kriteria Huang *et al*⁽⁴⁾ dan Yuniarti *et al*⁽⁵⁾, 3NTG dan 3LN0 dinilai sangat baik dan baik untuk mengidentifikasi ligan-ligan COX-2 dari *decoy*. Karena nilai diatas dapat diterima, kami ingin mengembangkan protokol yang mampu untuk uji

single compound. Oleh karena itu diperlukan sebuah senyawa pembanding dengan nilai MCC (*Matthews Correlation Coefficient*) tertinggi/MCC_{max}⁽⁵⁾. Selain dengan EF_{20%} dan EF_{max} sebagai fungsi objektif, protokol skrining virtual berbasis struktur (SVBS) juga menggunakan penilaian dari nilai MCC dan nilai EF pada saat nilai MCC paling tinggi (MCC_{max}). Walaupun untuk nilai MCC belum ada penelitian yang menyatakan berapa nilai MCC yang dapat diterima, namun dengan MCC yang merupakan padanan nilai *r* (*Pearson's coefficient correlation*) maka dapat dikatakan nilai dibawah 0-0,05 dikatakan memiliki korelasi lemah dan diatas 0,8 memiliki korelasi kuat. Berbeda dengan EF_{20%} dan EF_{max}, nilai MCC_{max} digunakan untuk mencari ligan yang digunakan sebagai



Gambar 4. Senyawa pembanding terpilih di masing-masing kristal struktur: A. Pose ZINC03814604 (3NTG) dan B. Pose ZINC03814753 (3LN0) dalam loka sisi aktif COX-2.

Tabel 3. Shell script protokol tervalidasi.

Isi dari protokol AYO_COX2_V.1.1	Isi dari protokol AYO_COX2_V.1.2
<pre>#!/bin/sh rm -rf penapisan mkdir penapisan cd penapisan cp ../config.txt . cp ../protein.mol2 . cp ../ZINC03814604.mol2 . export PLANTS='/home/oisan/PLANTS' bkchem uji.mol babel --gen3d -p 7.4 --title uji -imol uji.mol -omol2 uji.mol2 obconformer 10 1000 uji.mol2 > min_uji.mol2 \$PLANTS/SPORES --mode settypes min_uji.mol2 uji.mol2 cat ZINC03814604.mol2 uji.mol2 > ligand_input.mol2 \$PLANTS/PLANTS1.2 --mode screen config.txt rm config.txt protein.mol2 ZINC03814604.mol2 grep -Ev TOTAL results/bestranking.csv awk -F, '{print \$1" "\$2}' > hasil.tmp sed "s/_entry_00001_conf_01//g" hasil.tmp > hasil.tmp2 sed "s/_entry_00002_conf_01//g" hasil.tmp2 > hasil.txt more hasil.txt rm hasil.tmp* cd .. echo " " echo "bagaimana prediksi senyawa uji anda?"</pre>	<pre>#!/bin/sh rm -rf penapisan mkdir penapisan cd penapisan cp ../config.txt . cp ../protein.mol2 . cp ../ ZINC03814753.mol2 . export PLANTS='/home/yanti/PLANTS' bkchem uji.mol babel --gen3d -p 7.4 --title uji -imol uji.mol -omol2 uji.mol2 obconformer 10 1000 uji.mol2 > min_uji.mol2 \$PLANTS/SPORES --mode settypes min_uji.mol2 uji.mol2 cat ZINC03814604.mol2 uji.mol2 > ligand_input.mol2 \$PLANTS/PLANTS1.2 --mode screen config.txt rm config.txt protein.mol2 ZINC03814753.mol2 grep -Ev TOTAL results/bestranking.csv awk -F, '{print \$1" "\$2}' > hasil.tmp sed "s/_entry_00001_conf_01//g" hasil.tmp > hasil.tmp2 sed "s/_entry_00002_conf_01//g" hasil.tmp2 > hasil.txt more hasil.txt rm hasil.tmp* cd .. echo " " echo "bagaimana prediksi senyawa uji anda?"</pre>

ligan pembanding yang mampu membedakan senyawa aktif dan inaktif untuk penapisan virtual. Dari hasil SBVS dapat dilihat bahwa MCC_{max} yang paling baik diambil dari validasi retrospektif dengan pengaturan default yaitu pada kode PDB 3NTG dan 3LN0 yang dikembangkan pada penelitian dikategorikan sangat baik dan baik berdasarkan nilai $EF_{20\%}$ dan EF_{max} -nya sehingga dapat digunakan untuk penapisan virtual⁽⁵⁾. Oleh karena itu perlu diidentifikasi senyawa baku untuk skrining virtual tunggal dengan melihat senyawa pada hasil SVBS yang memiliki nilai MCC_{max} ⁽⁵⁾. Dalam hal ini ditemukan senyawa pembanding terpilih yaitu ZINC03814604 untuk protokol dengan kode PDB 3NTG dan ZINC03814753 untuk protokol dengan kode PDB 3LN0 seperti digambarkan pada Gambar 4. Berdasarkan hasil tersebut dibuat protokol SBVSAYO_COX2_v.1.1(3NTG) dan AYO_COX2_v.1.2(3LN0) dengan *shell script* disajikan pada Tabel 3.

SIMPULAN

Hasil konstruksi dan validasi protokol skrining virtual berbasis struktur dengan kode protein PDB 3MQE, 3NTG, dan 3LN0 menggunakan perangkat lunak PLANTS, SPORES, BKChem, Open Babel dan The Directory of Useful Decoys (DUD) yang merupakan *dataset* COX-2 yang digunakan untuk validasi retrospektif protokol, berdasarkan kriteria nilai $EF_{20\%}$ dan EF_{max} . Dalam artikel Huang *et al*⁽⁴⁾ dan Yuniarti *et al*⁽⁵⁾ dihasilkan dua protokol yang menunjukkan hasil yang sangat baik dan baik yaitu protokol tervalidasi AYO_COX2_v.1.1 dan AYO_COX2_v.1.2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Agarwal S, Reddy GV, and Reddanna P. Eicosanoids in inflammation and cancer: the role of COX-2. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2009. 5:145-65.
2. Inotai A, Hanco B, and Meszaros A. Trends in the non-steroidal anti-inflammatory drug market in six Central-Eastern European countries based on retail information. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2010. 19:183-90.
3. Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2011. 105:13-7.
4. Huang N, Shoichet BK, and Irwin JJ. Benchmarking sets for molecular docking. *J. Med. Chem.* 2006. 49:6789-801.
5. Yuniarti N, Ikawati Z, and Istyastono EP. The importance of ARG513 as a hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitors in a virtual screening campaign. *Bioinformatics.* 2011. 6:164-6.
6. Kellenberger E, Foata N, and Rognan D. Ranking targets in structure-based virtual screening of three dimensional protein libraries: methods and problems. *J. Chem. Inf. Model.* 2008. 48:1014-25.
7. Kellenberger E, Rodrigo J, Muller P, Rognan D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins.* 2004. 57:225-42.
8. De Graaf C and Rognan D. Customizing G Protein-coupled receptor models for structure-based virtual screening. *Curr. Pharm. Des.* 2009. 15:4026-48.
9. Prasajo SL, Hartanto FAD, Yuniarti N, Ikawati Z, Istyastono EP. Docking of 1-phenylsulfonamide-3-trifluoromethyl-5-parabromophenyl-pyrazole to cyclooxygenase-2 using PLANTS. *Indonesian Journal of Chemistry.* 2010. 10:348-51.
10. Kufareva I, Rueda M, Katritch V, Stevens RC, Abagyan R, Participants of GPCR Dock 2010. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure.* 2011. 19(8): 1108-26.