



Virtual Screening Natural Compounds from Plants as Inhibitor of Estrogen Receptor Alpha I (ESR1)

Andi T. Kusuma^{1*}, Daryono Hadi²

¹Departement Chemical ,Pharmacy of Faculty Moeslem University of Indonesia, Makassar, Indonesia

²Departement Chemical, School of Pharmacy Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia

Submitted 12 Oktober 2018; Revised 12 Desember 2018; Accepted 16 Januari 2019; Published 31 Maret 2019

*Corresponding author: anditrihadikusuma.kisra@umi.ac.id

Abstract

Flavanoid is one of the chemical compounds found in plants. Isoflavones (*1,2-diarylpropane*) are the largest group in the flavanoid that can be used to study the anticancer activity. 2IOK is one of target inhibitors which is obtained from natural product compounds. The purpose of the research is to design new compounds have anti-cancer activity, especially for breast cancer based on the evaluation of the affinity of the compound against Estrogen Receptor Alpha (ESR1) using the computational method. The parent compound is the test structure of isoflavones which has been reported to have anticancer activity, particularly for breast cancer. Based on the results of the validation method of docking with several combinations, the best method found was Triangle matcher-Affinity dG with an RMSD of 1,0452. Furthermore, this model provides ROC graph value of 0,863. Therefore, the method was used to screen compounds in the UI database. Three compounds were obtained from the process, which are potentially active against Estrogen Receptor Alpha (ESR1), namely C00010051, C00026048, C00025295. The MD simulations of protein-ligand complexes indicated exchanges process, namely the absence of interaction between the ligand with the Phe404, instead of the ligand formed hydrogen bonding with Glu353. Meanwhile, the C00025295 compound formed hydrogen bonding with the Leu346 residue.

Keywords: ESR1, molecular docking, molecular dynamic, virtual screening

Skrining Virtual Senyawa Bahan Alam Sebagai Inhibitor *Estrogen Receptor Alpha I* (ESR1)

Abstrak

Flavanoid adalah salah satu senyawa kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Isoflavon (*1,2-diarylpropane*) adalah kelompok terbesar dalam flavanoid yang dapat digunakan untuk mempelajari aktivitas antikanker. 2IOK adalah salah satu inhibitor target yang diperoleh dari senyawa produk alami. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk merancang senyawa baru memiliki aktivitas antikanker, terutama untuk kanker payudara berdasarkan evaluasi afinitas senyawa terhadap *Estrogen Receptor Alpha* (ESR1) menggunakan metode komputasi. Senyawa induk adalah struktur uji isoflavon yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, terutama untuk kanker payudara. Berdasarkan hasil validasi metode *docking* dengan beberapa kombinasi, metode terbaik yang ditemukan adalah *Triangle matcher-Affinity dG* dengan RMSD 1,0452. Selanjutnya, model ini memberikan nilai grafik ROC 0,863. Oleh karena itu, metode ini digunakan untuk menyaring senyawa dalam database UI. Tiga senyawa diperoleh dari proses, yang berpotensi aktif terhadap *Estrogen Receptor Alpha* (ESR1), yaitu C00010051, C00026048, C00025295. Simulasi MD kompleks protein-ligan menunjukkan proses pertukaran, yaitu tidak adanya interaksi antara ligan dengan Phe404, bukan ligan yang membentuk ikatan hidrogen dengan Glu353. Sementara itu, senyawa C00025295 membentuk ikatan hidrogen dengan residu Leu346.

Kata kunci: ESR1, *molecular docking*, *molecular dynamic*, skrining virtual

1. Pendahuluan

Kanker merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Berdasarkan data *World Health Organization* dalam *World Cancer Burden* (2012) ada sekitar 14 juta kasus kanker baru dan 8,2 juta kematian yang disebabkan oleh kanker pada tahun 2012, dan kanker hati adalah kanker kedua penyebab kematian di seluruh dunia¹. Menurut laporan *American Cancer Society* dalam *Cancer Facts & Figures* (2014) diperkirakan ada 33.190 kasus baru kanker hati di AS selama tahun 2014². Angka kejadian kanker hati sekitar tiga kali lebih tinggi pada pria dibandingkan pada wanita. Dari tahun 2006 sampai 2010, nilai meningkat 3,7% per tahun pada pria dan 2,9% per tahun pada perempuan. Diperkirakan kematian akibat kanker hati pada tahun 2014 adalah 23.000 (7.130 perempuan, 15.870 pria) dan sebanyak 80% kasus kematian adalah karsinoma hepatoselular (KHS). Karsinoma hepatoselular (KHS) adalah kanker hati primer. Faktor resiko terjadinya KHS terkait dengan beberapa jenis penyakit, seperti infeksi hepatitis B dan C kronis, hepatitis alkoholik, nonalcohol steatohepatitis (NASH), diabetes melitus dan gangguan metabolik³. Terapi konvensional untuk KHS meliputi operasi, radioterapi, dan kemoterapi. Di antara terapi tersebut, kemoterapi dengan agen sitotoksik adalah pengobatan umum untuk KHS⁴. Dalam kemoterapi konvensional, efek samping biasanya terjadi di sebagian besar kasus karena tingkat toksisitas yang tinggi. Selain itu, pengembangan resistensi obat terhadap agen kemoterapi sering mencegah penggunaan jangka panjang terhadap keberhasilan kemoterapi untuk kanker hati⁵. Maka perlu dilakukan pengembangan obat kemoterapi dengan aktivitas yang tinggi dan toksisitas yang rendah.

Selanjutnya, perlu dilakukan penelitian dengan metode *virtual screening* yang merupakan salah satu penunjang dalam penemuan dan pengembangan obat baru. Dengan metode *virtual screening* proses pengembangan dan sintesis obat menjadi lebih cepat, efisien dan terarah. Penelitian ini bertujuan untuk memilih kombinasi

deskriptor yang berkorelasi tinggi terhadap aktivitas antikanker senyawa (PDB ID: 2IOK, Res: 2,40 Å) [7] kompleks dengan selektif ampuh inhibitor ^oN-[(1*R*)-3-(4-hidroksifenil)-1-methylpropyl]-2-(2-fenil-1*H*-indol-3-yl) dalam bentuk persamaan ROA-AUC, mendesain senyawa turunan baru yang memiliki potensi antikanker dari puluhan ribu struktur yang diperoleh dari *database*, prediksi toksisitas dan afinitas senyawa turunan terhadap ESR1 (*Estrogen Receptor alpha*) melalui kajian interaksi senyawa dengan reseptor (*docking*).

Metode komputasi dapat memprediksi interaksi yang mungkin antara senyawa bioaktif dan protein target sehingga dapat diperoleh pemahaman dan gambaran tentang mekanisme kerjanya. Dalam pengembangan obat, jika struktur tiga dimensi (3D) atau model dari target obat tersedia, dapat digunakan teknik perancangan obat dengan bantuan komputer (*Computer-Aided Drug Design*) yang berbasiskan struktur (*Structure-Based Drug Design*) untuk mensimulasi penambatan (*docking*) senyawa uji ke dalam struktur protein target dengan berbagai posisi, konformasi dan orientasi. Sejumlah besar program *docking* telah dipublikasi salah satu di antaranya adalah AutoDock yang digunakan dalam penelitian ini. Berkas keluaran penambatan menggunakan AutoDock adalah pose *docking* dan energi bebas tiap pose tersebut. Penentuan afinitas didasarkan pada nilai terendah energi bebas ikatan⁶.

Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini dirancang untuk mengevaluasi afinitas senyawa dari *Estrogen Receptor Alpha* terhadap sel kanker pada beberapa protein yang telah diketahui merupakan target kerja sel kanker. Selain itu juga dilakukan studi toksisitas menggunakan perangkat lunak *ADMET Predictor* dan proses *Molecular Dynamic* (MD). Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian ekperimental selanjutnya dalam rangka pengembangan obat dengan beberapa tanaman yang berpotensi sebagai antikanker khususnya kanker payudara.

2. Metode

2.1. Alat

a. Hardware

Notebook ASUS A455L *processor* Intel® Core™ i5-5500U CPU @ 2.40 GHz, 4.00 Gb RAM (Sistem Operasi: Microsoft Windows 7 Pro 64-bit; Memori: 2 GB; Prosesor: Intel Celeron 1.6 GHz), *Server Computer* (Sistem Operasi: Kubuntu 14.04 64-bit; Memori: 16 GB; Prosesor: 16 x Intel Xeon 2.4 GHz).

b. Software

Decoy Finder 2.0⁷ (Cereto-Massagué dkk. 2012), FAF-Drugs³⁸ (<http://fafdrugs3.mti.univ-paris-diderot.fr>), MOE 2014.0901⁹, Pharmit (<http://pharmit.csb.pit.edu>)¹⁰, Marvin Suite 16.8.1¹¹, Avogadro 1.2.0¹², MayaChemTools¹³, Screening Explorer¹⁴, GROMACS 2016.3¹⁵.

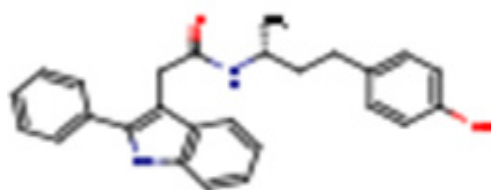
2.2. Bahan

Senyawa uji merupakan struktur induk dari Isoflavon^{16,17}. Senyawa yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker.

Kontrol positif adalah senyawa yang berdasarkan hasil eksperimen bersifat toksik. Kontrol negatif adalah senyawa yang berdasarkan hasil eksperimen bersifat nontoksik.

Protein target beberapa antikanker dan ID PDBnya: (PDB ID: 2IOK, Res: 2,40 Å) [7] kompleks dengan selektif ampuh inhibitor ^oN-[(1R)-3-(4-hidroksifenil)-1-methylpropyl]-2-(2-fenil-1H-indol-3-YL) dan struktur dari semua *phytochemical*.

Ligan Alami (*co-crystallised ligand*) yang digunakan adalah *Human Estrogen Alpha Ligand-Binding Domain in Complex with Compound 1D, Estrogen Receptor Alpha (ESR1)*, ^oN-[(1R)-3-(4-hidroksifenil)-1-methylpropyl]-2-(2-fenil-1H-indol-3-YL).



Gambar 1. Struktur *Estrogen Receptor Alpha*

2.3. Prosedur

2.3.1. Docking Ligan-Reseptor

a. Preparasi Protein Target dan Ligan

Struktur kristal protein target diperoleh dari *Protein Data Bank* diseparasi dari ligan ko-kristalnya menggunakan MOE dan selanjutnya digunakan untuk validasi. MOE digunakan untuk menambahkan hidrogen polar, menambahkan muatan parsial Gasteigers dan menyimpan semua struktur protein dalam format PDB. *Auto Grid* digunakan untuk menentukan *binding site* ligan pada reseptornya.

Struktur 3D ligan uji yaitu senyawa metabolit sekunder didesain menggunakan MOE dan dioptimasi menggunakan perhitungan semi empirik PM3. MOE digunakan untuk menggabungkan hidrogen nonpolar, menambahkan muatan parsial Gasteigers dan mengatur *rotatable bonds* dengan Auto Tors.

b. Validasi Docking dan Skor

Untuk validasi *docking*, ligan yang digunakan adalah ligan ko-kristal. Ligan ini di-*docking* terhadap protein targetnya masing-masing menggunakan MOE. Hasil prediksinya dibandingkan dengan binding pose ko-kristal eksperimental dan dihitung RMSDnya (*root mean square deviation*).

Untuk validasi skor, hasil skor MOE dibandingkan dengan nilai inhibisi (Ki) eksperimental, kemudian dihitung nilai ρ (*Spearman rank correlation*) dan r (*Pearson correlation coefficient*).

c. Virtual Screening

Setiap ligan uji dilakukan *docking* terhadap semua protein target menggunakan MOE. Moe digunakan untuk analisis manual pose *docking*-nya pada sisi aktif setiap protein.

2.3.2. Prediksi Toksisitas

a. Optimasi Senyawa

Senyawa uji, kontrol positif dan kontrol negatif digambar dan dioptimasi menggunakan MOE v.14. Optimasi dilakukan dengan metode Hartree-fock basis set 6-31G, semi empirik PM3, dengan waktu optimasi tergantung dari masing-masing senyawa.

Tabel 1. *Contingency Table*

Frekuensi Populasi		Hasil Pengujian		
Hasil Referensi	Positif	Negatif	Total	
	Positif	a	b	a+b
	Negatif	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Sensitivity : $a/(a+b)$; *Specificity* : $d/(c+d)$; *Accuracy* : $(a+d)/(a+b+c+d)$; *Positive Predictivity* : $a/(a+c)$; *Negative Predictivity* : $d/(b+d)$; *False Positive* : $c/(c+d)$; *False Negative* : $b/(a+b)$

b. Verifikasi *ADMET Predictor*

Verifikasi menggunakan senyawa kontrol positif dan kontrol negatif yang telah dioptimasi sebelumnya. Suatu model pengujian yang hasilnya dinyatakan dalam dua kategori yaitu hasil positif dan negatif maka *goodness-of-fit* model pengujian tersebut dapat dinilai menggunakan *Cooper Statistic* berdasarkan data pada matriks 2x2 (*contingency table*) pada Tabel 1.

c. Prediksi Toksisitas

Prediksi terhadap senyawa uji dilakukan dengan menggunakan *ADMET Predictor*. Hasil prediksi berupa data senyawa yang toksik dan nontoksik.

d. Prediksi Metabolisme pada Sitokrom P450

Prediksi metabolisme dilakukan terhadap senyawa tertentu yang diprediksi positif toksik. Prediksi metabolisme pada sitokrom P450 digambarkan dengan 5 pemodelan, yaitu *Kinetic Models for Human Cytochrome P450 Enzymes* untuk menentukan

nilai K_m (konstanta Michaelis Menten), V_{max} (laju metabolime maksimum) dan Cl_{int} (klirens intrinsik), *Inhibition Models for Cytochrome P450*, *Probability of Metabolism for Human UGT*, *Regioselectivity Models for Human Cytochrome P 450 Enzymes* dan *Substrate Classification Models for Cytochrome P450*.

e. Prediksi Toksisitas Metabolit

Prediksi toksisitas metabolit masing-masing senyawa dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *ADMET Predictor*.

3. Hasil Penelitian

3.1. Docking Ligan-Reseptor

a. Preparasi Molekul *Training Set* dan *Decoy*

Telah dilakukan proses penggambaran struktur dua dimensi dan optimasi geometri tiga dimensi dari dua puluh molekul *training set*. Sementara itu, untuk prosedur penyiapan struktur ESR1 terdapat koreksi pada ikatan rangkap cincin propil. Kedua puluh *file*

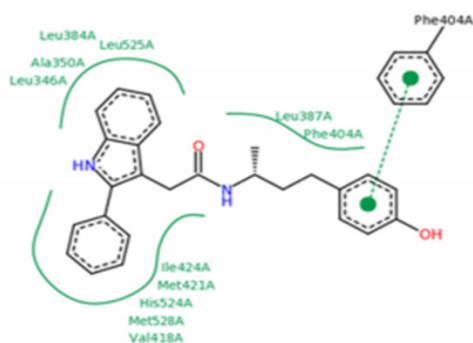
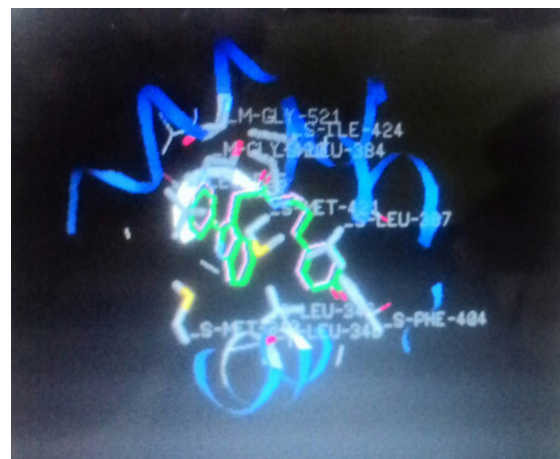


Fig. 3. Binding site in Human estrogen receptor comprised of Leu346, Ala350, Leu384, Leu387, Phe404, Val418, Met421, Ile424, His524 and Leu525



Gambar 2. Visualisasi *Estrogen Receptor Alpha*

Tabel 2. *Training set 20 senyawa aktif dari DUD.E*

No	Rumus Kimia	Nama Ligan	Nama Mol
1	CHEMBL 182342	Actives_final_000002.pdbqt	Actives_final_000002.mol2
2	CHEMBL 64692	Actives_final_000003.pdbqt	Actives_final_000003.mol2
3	CHEMBL 1082743	Actives_final_000004.pdbqt	Actives_final_000004.mol2
4	CHEMBL 328475	Actives_final_000005.pdbqt	Actives_final_000005.mol2
5	CHEMBL 371072	Actives_final_000007.pdbqt	Actives_final_000007.mol2
6	CHEMBL 144195	Actives_final_000008.pdbqt	Actives_final_000008.mol2
7	CHEMBL 569766	Actives_final_000010.pdbqt	Actives_final_000010.mol2
8	CHEMBL 66279	Actives_final_000011.pdbqt	Actives_final_000011.mol2
9	CHEMBL 184958	Actives_final_000012.pdbqt	Actives_final_000012.mol2
10	CHEMBL 80124	Actives_final_000016.pdbqt	Actives_final_000016.mol2
11	CHEMBL 400480	Actives_final_000017.pdbqt	Actives_final_000017.mol2
12	CHEMBL 121879	Actives_final_000018.pdbqt	Actives_final_000018.mol2
13	CHEMBL 181191	Actives_final_000019.pdbqt	Actives_final_000019.mol2
14	CHEMBL 316132	Actives_final_000020.pdbqt	Actives_final_000020.mol2
15	CHEMBL 93826	Actives_final_000021.pdbqt	Actives_final_000021.mol2
16	CHEMBL 329312	Actives_final_000027.pdbqt	Actives_final_000027.mol2
17	CHEMBL 99335	Actives_final_000028.pdbqt	Actives_final_000028.mol2
18	CHEMBL 202472	Actives_final_000029.pdbqt	Actives_final_000029.mol2
19	CHEMBL 470993	Actives_final_000030.pdbqt	Actives_final_000030.mol2
20	CHEMBL 299942	Actives_final_000031.pdbqt	Actives_final_000031.mol2

senyawa training set tersebut disimpan dalam format ekstensi *file *.mol2* dan kemudian disatukan dalam format ekstensi *file *.sdf*.

pada kuva ROC pada Gambar 3, sedangkan hasil kombinasi *placement scoring* dan *scoring function* tertera pada Tabel 3.

b. Validasi *Docking* dan Skor

Hasil validasi *docking* dapat dilihat

c. *Virtual Screening*

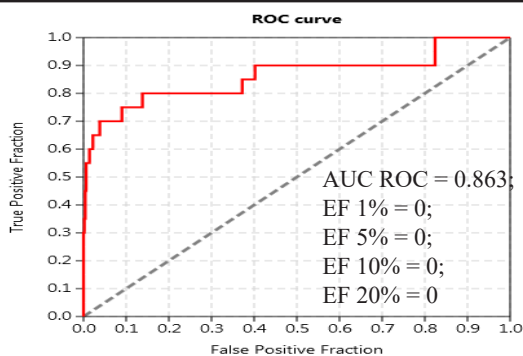
Hasil analisis manual pose *docking*-

Tabel 3. Hasil Validasi *Re-docking* Kombinasi *Placement Scoring* dan *Scoring Function*

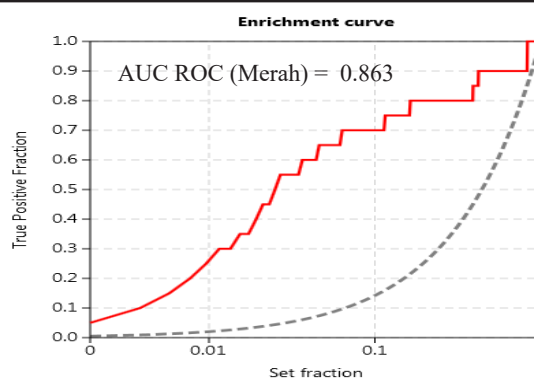
<i>Scoring Placement</i> ↓	<i>Affinity dG</i>	<i>Alpha HB</i>	<i>ASE</i>	<i>London dG</i>
<i>Alpha PMI</i>	1,6043 (9)	1,6403 (4)	1,6403 (5)	1,6403 (1)
<i>Alpha Triangle</i>	3,8420 (2)	1,8721 (3)	1,8721 (2)	4,0497 (6)
<i>Proxy Triangle</i>	2,9586 (2)	1,7874 (4)	1,6605 (1)	1,6605 (9)
<i>Triangle Matcher</i>	1,0452 (3)	3,0175 (10)	4,429 (1)	3,3733 (2)

Tabel 5. Komparasi Hasil *Docking* dengan Simulasi MD

Senyawa	Residu yang berinteraksi	
	Hasil docking	Hasil MD (20 ns)
ESR1	Phe404	Met343
	Met343	Glu353
	Glu353	
Database UI C00010051	Phe404	Glu353
	Leu346	
Database UI C00026048	Leu387	
	Phe404	Glu353
Database UI C00025295	Glu353	
	Phe404	Leu346
	Leu346	



Gambar 3. Kurva ROC, nilai Enrichment Factor dan AUC-ROC dari validasi metode Triangle Matcher-Affinity dG terhadap dataset



Gambar 4. Kurva ROC dan nilai AUC-ROC dari validasi metode Triangle Matcher-Affinity dG (merah) terhadap dataset

nya pada sisi aktif setiap protein, dari 1 konformasi, direplikasi masing-masing 100 kali, dan didapatkan urutan pertama dari masing-masing dan didapatkan 10 *ranking* teratas.

d. Molekuler Dinamik

Hasil simulasi molekuler dinamik untuk senyawa ESR1, UI C00010051, UI C00026048, dan UI C00025295 dapat dilihat pada tabel 5.

4. Pembahasan

4.1. Docking Ligan-Reseptor

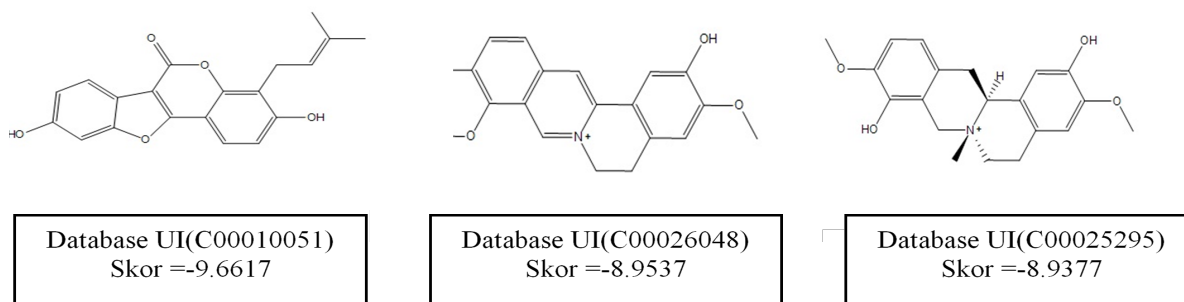
a. Preparasi Molekul *Training Set* dan *Decoy*

Telah dilakukan proses penggambaran struktur dua dimensi dan optimasi geometri tiga dimensi dari dua puluh molekul *training set*. Sementara, untuk prosedur penyiapan struktur ESR1 terdapat koreksi pada ikatan rangkap cincin propil. Kedua puluh *file* senyawa *training set* tersebut disimpan dalam format ekstensi *file* *.mol2 dan kemudian

disatukan dalam format ekstensi *file* *.sdf. Selain itu, juga dipersiapkan sebanyak 500 senyawa *decoy set* yang diambil dari database *UI drug-like*. Luaran file dari Decoy Finder sudah berada dalam format ekstensi *.sdf. Kemudian dilakukan konstruksi *database* multikonformer dari semua senyawa tersebut dan didapatkan 305 konformer *training set* dan 4.002 konformer *decoy* yang masing-masing diunggah ke Pharmit dalam format ekstensi *file* *.sdf.

b. Filter Drug-Likeness, Toksisitas, dan PAINS

Sebanyak 6.733 senyawa yang didapat dari hasil penapisan berbasis farmakofor kemudian disaring menggunakan tiga kriteria *drug-likeness* (*Lipinski Rule of Five*)¹⁸, Weber¹⁹, dan jumlah inti aromatik²⁰. Proses tersebut menyisakan sebanyak 5.677 senyawa. Selanjutnya, dilakukan penyaringan berbasis toksisitas dan PAINS²¹ dengan FAF-Drugs3. FAF-Drugs3 hanya dapat memproses sebanyak 4.002 senyawa dalam sekali analisis,



Gambar 5. Senyawa terpilih untuk tahap MD

Tabel 4. Nilai Log (Δ energi) dari masing-masing 20 struktur aktif ESR1

Ligand	Log
Out.02	-12,0
Out.03	-10,3
Out.04	-9,2
Out.05	-11,6
Out.07	-9,7
Out.08	-9,7
Out.10	-10,9
Out.11	-9,7
Out.12	-11,4
Out.16	-9,3
Out.17	-10,2
Out.18	-7,8
Out.19	-8,6
Out.20	-8,2
Out.21	-10,1
Out.27	-11,5
Out.28	-10,0
Out.29	-8,1
Out.30	-10,6
Out.31	-9,1

sehingga senyawa yang dianalisis dikerjakan dalam 1 betas, masing-masing sebanyak 6.733 senyawa. Hasil yang didapatkan dari prosedur ini adalah sebanyak 4.002 senyawa masuk kategori *Accepted* (tidak ditemukan adanya gugus toksikofor maupun PAINS), 1.056 senyawa masuk kategori *Intermediate* (ditemukan gugus toksikofor beresiko rendah dan PAINS), 408 senyawa masuk kategori *Rejected* (ditemukan gugus toksikofor beresiko tinggi atau gugus beresiko rendah dalam jumlah banyak dan PAINS), dan 6 senyawa tidak dianalisis karena termasuk ke dalam golongan senyawa organologam. Sebanyak 4.002 senyawa yang termasuk dalam kategori *Accepted* akan dilanjutkan untuk proses penambatan molekul.

c. Penambatan Molekul Tahap I (*Rigid Receptor Docking*): Preparasi Ligan dan Protein

Telah dilakukan proses preparasi protein (PDB:2IOK) dengan mengeliminasi air, melengkapi sekuens asam amino yang hilang, menambahkan atom hidrogen, minimisasi

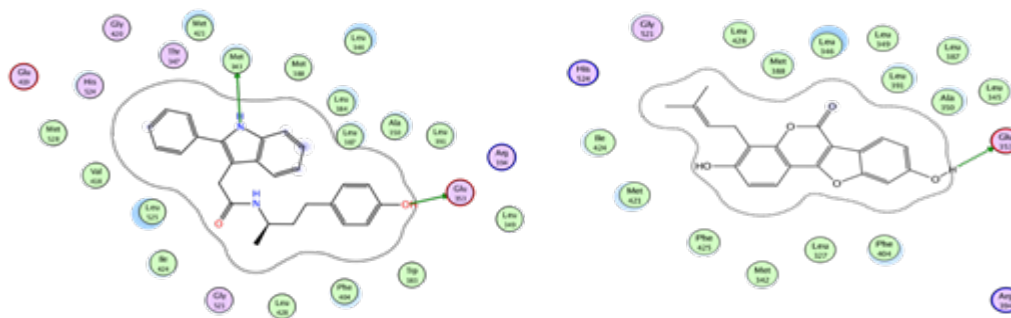
energi kompleks serta penambahan muatan parsial dengan medan gaya Amber12-EHT. Ketiga perlakuan yang disebut terakhir ini dilakukan dengan bantuan modul LigX pada MOE. Selain itu, preparasi juga dilakukan terhadap *training set* dan *decoy*. Semua senyawa tersebut disiapkan ke dalam satu *dataset* dan diberikan muatan parsial berbasis medan gaya MMFF94X.

4.2. Validasi Metode

Validasi metode yang dilakukan pertama kali adalah *re-docking*. Prosedur ini dilakukan dengan mencoba semua kombinasi *placement scoring* dan *scoring function* yang tersedia pada modul *docking* MOE. Sebanyak 100 *docking pose* dihasilkan untuk setiap kombinasi dan evaluasi dilakukan terhadap 10 *docking pose* dengan skor terendah. Parameter yang dievaluasi adalah nilai RMSD tiap *docking pose* dan reratanya.

Hasil validasi menunjukkan bahwa kombinasi *placement scoring Triangle Matcher* dan *scoring function Affinity dG* menghasilkan rerata RMSD terendah (1,0452 Å) dengan 6 dari 10 pose memiliki nilai $\text{RMSD} < 2.0 \text{ Å}$. Kombinasi tersebut kemudian dievaluasi lebih lanjut terkait dengan kemampuan *virtual screening* terhadap *dataset* yang telah disiapkan berdasarkan parameter AUC ROC (>0.5) dan nilai *Enrichment Factor* (EF) pada beberapa titik (1%;5%;10%;20%). Hasil yang didapatkan (Gambar 3) menunjukkan bahwa kombinasi *Triangle Matcher* dan *Afinity dG* memiliki performa yang lebih baik dengan penapisan acak^{22,23}. Evaluasi performa dilakukan dengan melihat nilai *Enrichment Factor* 1%, 5%, 10%, dan 20% (Tabel 4). Model terbaik kemudian dievaluasi lebih lanjut melalui kurva ROC (Gambar 4).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penambahan *scoring function Affinity dG* memberikan nilai EF 1% yang cukup baik sebesar 19 yang merupakan hasil kontribusi dari ditemukannya lima senyawa *training set*. Akan tetapi, hingga *dataset* 20%, tidak lagi ditemukan senyawa *training set* yang ditunjukkan dengan penurunan drastis nilai EF 5% hingga EF 20%. Sementara itu,



Gambar 6. Hasil superposisi docking pose dari senyawa Database UI C00010051, terhadap ligan alami

penambahan *scoring function Affinity dG* memberikan nilai EF yang cukup baik. Total ditemukan 3 senyawa *training set* pada *dataset* 20%. Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas, digunakan analisis kurva ROC terhadap kedua kombinasi tersebut. Hasilnya menunjukkan bahwa metode dengan *docking score Affinity dG* memiliki performa yang lebih baik, dengan nilai AUC-ROC sebesar 0,863. Sehingga metode ini digunakan dalam proses penambatan molekul. Selain itu, titik penyaringan senyawa pada tahap ini ditentukan sebesar 1% dari *dataset*.

4.3. Penambatan Molekul

Penambatan molekul dilakukan terhadap 4022 senyawa dengan kombinasi *placement scoring Triangle Matcher*, *scoring function pertama Affinity dG*, sesuai dengan hasil validasi metode yang diperoleh sebelumnya. Sebanyak 1% senyawa dengan *docking score* terendah (170 senyawa) dipilih untuk disaring lebih jauh. 170 senyawa dengan pengaturan sebanyak 10 *docking pose* dihasilkan per

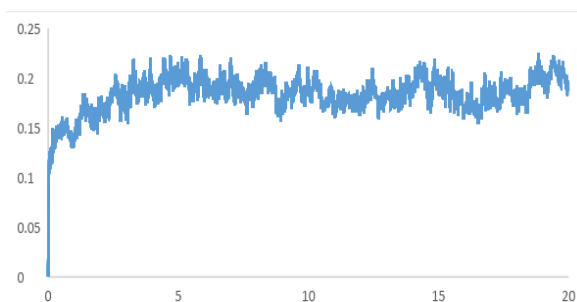
senyawa. Total dihasilkan sebanyak 17.165 *docking pose* yang kemudian disaring dengan sidik jari Me343 D dan Glu353 D. Hasilnya ditemukan sebanyak 300 *docking pose* dengan pola dan jenis interaksi yang sesuai.

4.4. Inspeksi Visual

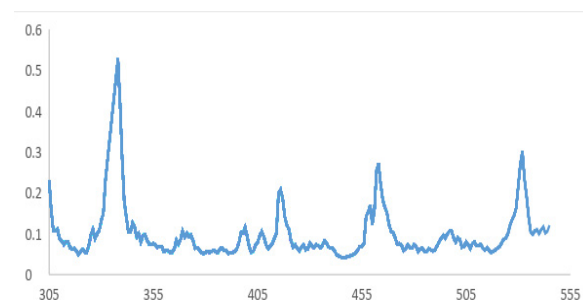
Prosedur inspeksi visual kemudian dilakukan terhadap 300 *docking pose* dan didapatkan sebanyak 3 *docking pose* dari 170 senyawa memiliki orientasi yang memenuhi kriteria. Contoh *docking pose* yang memenuhi kriteria seperti tercantum pada Gambar 7, yaitu berdasarkan okupasi senyawa pada tapak ikatan *N-[1R)-3-(4-hidroksifenil)-1-methylpropyl]-2-(2-fenil-1H-indol-3-yl)*.

4.5. Molecular Dynamics (MD)

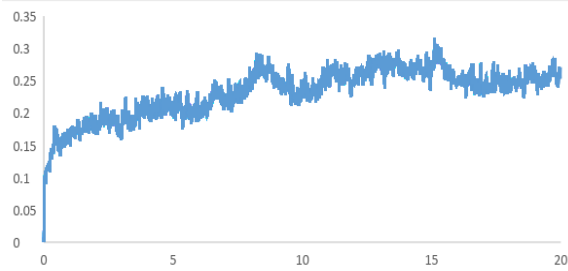
Berdasarkan *docking score*, dipilih tiga senyawa (Database UI C00010051, Database UI C00026048, dan Database UI C0025295) beserta ligan alami (*Estrogen Receptor Alpha*) untuk dilanjutkan ke dalam simulasi MD dengan menggunakan piranti



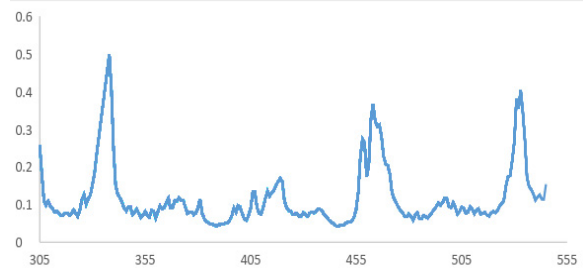
Gambar 7. Plot RMSD backbone protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00010051



Gambar 8. Plot RMSF residu asam amino protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00010051



Gambar 9. Plot RMSD backbone protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00026048



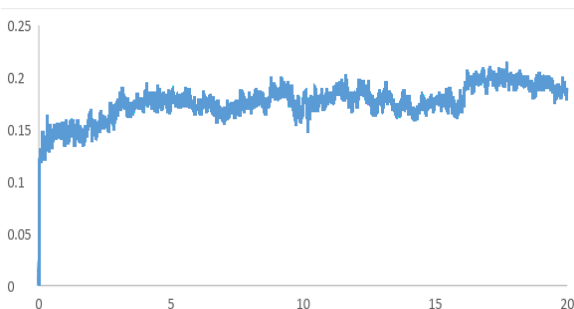
Gambar 10. Plot RMSF backbone protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00026048

lunak GROMACS¹⁵. Ketiga senyawa tersebut memiliki *docking score* yang lebih rendah dibandingkan dengan ligan alami (Skor = -9.6617, -8.9537, -8.9377). Simulasi MD merupakan model prediksi interaksi ligan-protein dalam kondisi biologis, sehingga model kompleks harus diatur berada dalam lingkungan yang menyerupai keadaan pada sistem biologis. Perlakuan yang digunakan antara lain adalah solvasi kompleks hasil docking dengan model air TIP3P²⁴, penambahan ion (Na⁺ dan Cl⁻), ekuilibrasi temperatur pada 310 K dengan *thermostat velocity rescale*²⁵ dan tekanan pada 1 bar dengan barostat Parrinello-Rahman²⁶. Demi menjaga konsistensi proses, tahapan minimisasi energi kompleks dilakukan dengan medan gaya dari famili AMBER^{27,28}. Hasil yang didapatkan dari simulasi selama 20 ns menunjukkan bahwa nilai RMSD sistem dari kompleks memiliki tendensi untuk mencapai konvergensi. Analisis dari plot RMSD atom *backbone protein* terhadap waktu simulasi mengindikasikan bahwa setelah terjadi

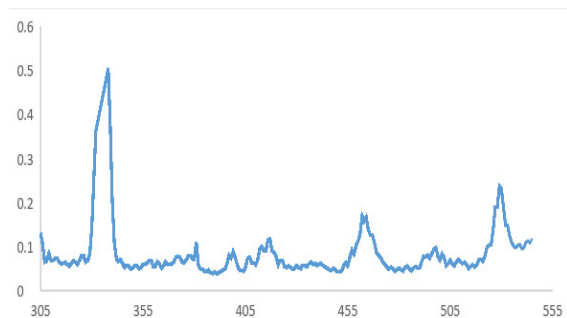
perubahan konformasi di fase awal simulasi, sistem terlihat cukup stabil di kisaran 0.15 Å-0.2 Å (Gambar 8) dan (Gambar 11). Selain itu juga dilakukan analisis terhadap fleksibilitas protein dengan menggunakan plot RMSF relatif terhadap residu asam amino protein. Kedua kompleks hasil *docking* menunjukkan profil yang identik dengan ligan alami, yaitu fluktuasi terutama pada residu 343-353 yang merupakan daerah antarmuka dimer dan juga meliputi daerah domain katalitik enzim⁴ serta pada residu 500 - 545 yang termasuk ke dalam Z-domain (Gambar 8), (Gambar 10), dan (Gambar 12).

5. Kesimpulan

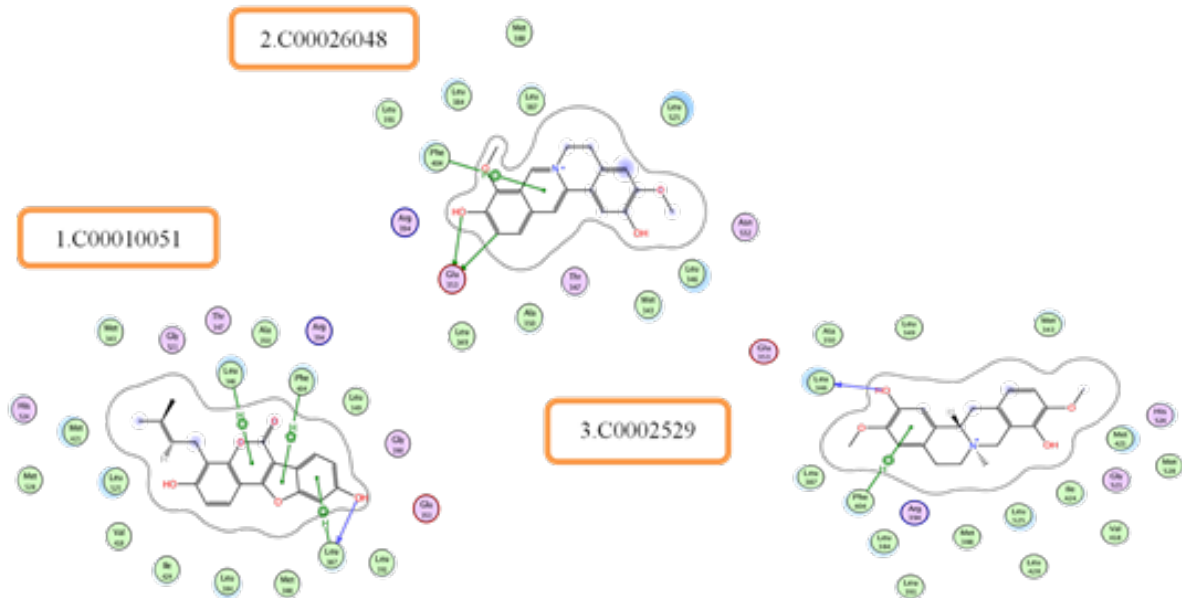
Berdasarkan hasil *virtual screening* dengan metode *docking*, *filter drug-likeness*, PAINS, dan toksisitas, penambahan molekul (*Rigid receptor*), serta studi *molecular dynamics* (MD) terhadap database UI, diperoleh 3 kandidat senyawa (Database UI C00010051, Database UI C00026048, dan Database UI C00025295) yang diprediksi akan



Gambar 11. Plot RMSD backbone protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00025295



Gambar 12. Plot RMSF backbone protein selama 20 ns simulasi dari kompleks ligan alami (biru) Database UI C00025295



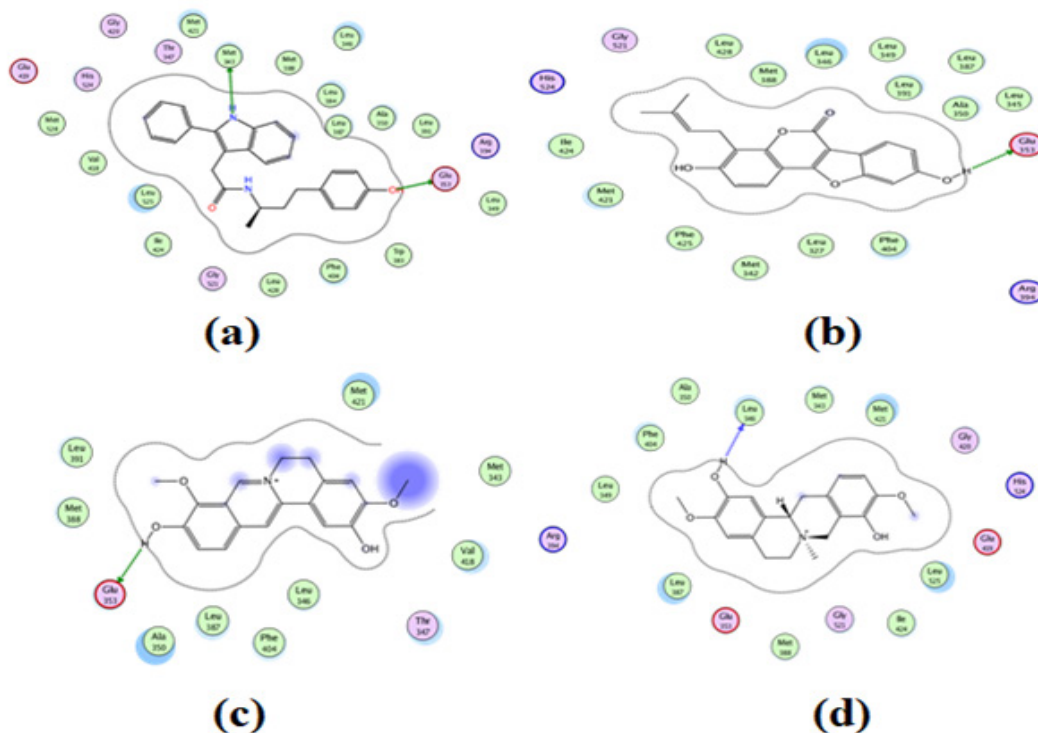
Gambar 13. Hasil *re-docking* tiga senyawa terbaik database UI

menginhibisi N - $[(1R)$ -3- (4-hidroksifenil) -1-methylpropyl] -2-(2-fenil-1H-indol-3-YL) melalui mekanisme inhibisi yang identik dengan *Estrogen Receptor Alpha*.

6. Saran

Dilakukan penelitian lebih lanjut dan

synthesis terhadap senyawa tersebut, untuk selanjutnya diuji kemampuan inhibisinya terhadap N - $[(1R)$ -3- (4-hidroksifenil) -1-methylpropyl] -2-(2-fenil-1H-indol-3-YL) dan dibandingkan terhadap *Estrogen Receptor Alpha*. Jika terbukti bahwa aktivitas senyawa tersebut setara, atau bahkan lebih baik,



Gambar 14. Superposisi ligan-protein sebelum dan setelah simulasi 20ns dari *Estrogen Receptor Alpha* (a), Database UI C00010051 (b), Database UI C00026048 (c), Database UI C00025295 (d)

maka akan dilakukan studi optimasi struktur molekul dengan metode HKSA.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization dalam World Cancer Burden (2012) Data of Cancer, WHO Press, UK
2. American Cancer Society (ACS), (2014): Cancer Facts & Figures 2014, www.cancer.org. diakses pada tanggal 16 Desember 2014.
3. American Cancer Society (ACS), (2015): Liver Cancer, <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003114-pdf> diakses pada tanggal 20 Februari 2015
4. Muhammad Usman Mirza, Saba Ferdous., (2013) : Docking Studies reveal Phytochemicals as the longsearched anticancer drugs for Breast Cancer., Center for Research in Molecular Medicine (CRiMM), Department of Computer Sciences City University London, UK
5. Liu, dkk (2013) The Potent Oxidant Anticancer Activity of Organoiridium Catalysts.
6. Kroemer et.al (2007) Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity.
7. Cereto-Massagué, A., Guasch, L., Valls, C., Mulero, M., Pujadas, G., dan Garcia-Vallvé, S. (2012): DecoyFinder: An Easy-to-Use Python GUI Application for Building Target-Specific Decoy Sets, *Bioinformatics*, 28(12), 1661–1662.
8. Lagorce, D., Sperandio, O., Baell, J.B., Miteva, M.A., dan Villoutreix, B.O. (2015): FAF-Drugs3: A Web Server for Compound Property Calculation and Chemical Library Design, *Nucleic Acids Research*, 43, W200–W207.
9. Molecular Operating Environment (MOE), v.2014.09.01, Chemical Computing Group Inc., 2014.
10. Sunseri, J., dan Koes, D.R. (2016): Pharmit: Interactive Exploration of Chemical Space, *Nucleic Acids Research*, 44, W442–W448.
11. Marvin Suite, v.16.8.1, ChemAxon, 2016.
12. Hanwell, M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., dan Hutchison, G.R. (2012): Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualisation, and Analysis Platform, *Journal of Cheminformatics*, 4(17), 1–17.
13. Sud, M., (2016): MayaChemTools: An Open Source Package for Computational Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(12), 2292–2297.
14. Empereur-Mot, C., Zagury, J-F., dan Montes, M. (2016): Screening Explorer – An Interactive Tool for the Analysis of Screening Results, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(12), 2281–2286.
15. Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., dan Lindahl, E. (2015): Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers, *SoftwareX*, 1–2, 19–25.
16. Blunt et.al (2012) , Marine natural products
17. Blunt, dkk (2015) Synthesis and Intracellular Redox Cycling of Natural Quinones and Their Analogues and Identification of Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) as Potential Target for Anticancer Activity.
18. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., dan Feeney, P.J. (1997): Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3–25.
19. Weber, dkk (2002) The Neuroendocrine-Derived Peptide Parathyroid Hormone–Related Protein Promotes Prostate Cancer Cell Growth by Stabilizing the Androgen Receptor
20. Ritchie, T.J., dan Macdonald, S.J.F. (2009): The Impact of Aromatic Ring Count on Compound Developability – Are Too Many Aromatic Rings a Liability in Drug Design?, *Drug Discovery Today*, 14(21), 1011–1020.
21. Baell, J.B., dan Holloway, G.A. (2010): New Substructure Filters for Removal

-
- of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7), 2719–2740.
22. Wang, R., dan Wang, S. (2001): How Does Consensus Scoring Work for Virtual Library Screening? An Idealized Computer Experiment, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41(5), 1422–1426.
 23. Feher, M. (2006). Consensus Scoring for Protein-Ligand Interactions, *Drug Discovery Today*, 11(9–10), 421–428.
 24. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., dan Klein, M.L.(1983): Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water, *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926.
 25. Bussi, G., Donadio, D., dan Parrinello, M. (2007): Canonical Sampling through Velocity Rescaling, *Journal of Chemical Physics*, 126(1).
 26. Parrinello, M., dan Rahman, A. (1981): Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method, *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182–7190.
 27. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., dan Shaw, D.E.(2010): Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958.
 28. Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., dan Case, D.A. (2004): Development and Testing of a General Amber Force Field, *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174.