




The Easiness in silico Drug Development against SARS-CoV-2 Protease using JAMDA

Broto Santoso¹ , Ratna Yuliani²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia

²Department of Molecular Biology, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia

 broto.santoso@ums.ac.id

 <https://doi.org/10.53017/ujhs.172>

Received: 15/02/2022

Revised: 25/03/2022

Accepted: 26/03/2022

Abstract

Drug development can be accelerated and facilitated through the method of in silico by utilising a browser-based application. Universität Hamburg through the ZBH Centre for Bioinformatics has been giving full access to its applications until now. One of them is JAMDA. Forty-five flavonoids have been used as case studies of ligand binding affinity screening for five SARS-CoV-2 proteases. The 3D conformations of ligands and proteins were downloaded from the PubChem and RCSB databases, respectively. OpenBabel was used to combine multiple ligands to speed up the computation. It took at least 7.5 hours to complete the whole process using a single browser tab. Molecules of GC376 non-sulphonate, R8H, and 6''-O-acetylastragalins have top best scores than all investigated ligands. Their average scores ratio is 1.239, 1.234 and 1.188 respectively. PLIP predictions indicate that water molecules are actively involved in protein ligand interactions for four crystals of native and 6''-O-acetylastragalins on several proteins. This browser-based application is fast and easy to use but it is not recommended to use for novel compounds due to data privacy which is not guaranteed by the owner.

Keywords: JAMDA; In Silico; Drug Development; Molecular Docking

Kemudahan Pengembangan Obat *in silico* menggunakan Aplikasi Daring JAMDA terhadap Protease SARS-CoV-2

Abstrak

Pengembangan obat dapat dipercepat dan dimudahkan melalui metode *in silico* dengan memanfaatkan aplikasi berbasis perambah. Universität Hamburg melalui Pusat Bioinformatik ZBH telah memberikan akses penuh untuk beberapa aplikasi, salah satunya adalah JAMDA. Empat puluh lima senyawa golongan flavonoid telah digunakan sebagai studi kasus skrining afinitas ikatan ligan terhadap lima protease SARS-CoV-2. Konformasi 3D protein dan ligan secara berurutan telah diunduh dari basis data RCSB dan PubChem. Openbabel digunakan untuk menggabungkan beberapa berkas ligan menjadi satu berkas untuk mempercepat proses. Proses kerja keseluruhan setidaknya dibutuhkan waktu 7,5 jam menggunakan perambah dengan tab tunggal. Senyawa GC376 non sulfonat, R8H, dan 6''-O-asetilastragalins mempunyai skor terbaik teratas dibandingkan dengan seluruh ligan yang diujikan. Nilai rerata rasio skor ketiganya secara berurutan adalah 1,239; 1,234 dan 1,188. Hasil prediksi PLIP menunjukkan bahwa molekul air terlibat aktif dalam interaksi ligan protein untuk empat ligan native kristal dan 6''-O-asetilastragalins pada beberapa protein target. Aplikasi berbasis perambah ini, JAMDA, cepat dan mudah untuk digunakan namun tidak dianjurkan untuk menguji senyawa baru yang belum ada dalam basis data mana pun dikarenakan faktor kerahasiaan data yang tidak dijamin.

Kata kunci: JAMDA; *In Silico*; Pengembangan Obat; *Docking*; Penambatan Molekul

1. Pendahuluan

Basis data molekul dan makromolekul telah tersedia dan dapat diakses secara bebas dan gratis seperti basis data PubChem, ZINC, Protein Data Bank RCSB dan masih banyak lagi. Jumlah data yang memuat konformasi struktur tiga dimensi molekul kecil dan protein target dengan ligan nativenya yang berhasil diidentifikasi terus bertambah dan meningkat jumlahnya. Sayangnya, sumber data yang melimpah ini baru dimanfaatkan oleh sebagian kecil penduduk di bumi dan sebagian besar diantaranya. Beberapa kendala yang menjadi penghambat pemanfaatan seluas-luasnya basis data ini diantaranya pengetahuan dan bidang keilmuan pengguna yang tidak terkait langsung, kebutuhan perangkat keras yang tidak murah dan fleksibel digunakan di mana saja, kemampuan bidang teknologi informasi yang minim. Sebaliknya, paralelisasi penggunaan basis data ini akan mengarahkan pada pengembangan obat yang lebih cepat.

Pengguna potensial membutuhkan aplikasi yang dapat diakses di mana pun dengan menggunakan perangkat yang dipunyai untuk mengoptimalkan penggunaan basis data. Salah satunya yang disarankan adalah *repurposing in silico* yang tergantung pada jumlah data molekul dan makromolekul yang digunakan dan dapat menjadi cara pengembangan obat yang dapat dipilih dan diaplikasikan. Teknik ini dapat dianalogikan dengan istilah obat *off-label* yang telah dikenal lebih dahulu atau efek *off-target* [1]. Metode kombinasi ini juga mirip dengan teknik *reverse docking* banyak senyawa. Aplikasi tingkat lanjut berikutnya adalah menggabungkannya dengan teknik kimia kombinatorial dan akan memberi langkah baru dalam penemuan novel senyawa obat atau rancang obat berbasis fragmen residu asam amino. Metode *in silico* merupakan bagian dari simulasi yang merupakan pilar ketiga sains bersama dengan pilar ilmu lainnya yaitu teori dan eksperimen.

Penambatan dan dinamika molekuler menjadi bagian penting dalam metode *in silico*. Tingkatan lebih lanjut dari keduanya adalah pemanfaatan data yang diperoleh melalui model intelegensi buatan dan *machine learning*. Adanya konektivitas maya melalui daring atau internet meningkatkan pemanfaatan big data molekul dan makromolekul. Lebih dari separuh masyarakat dunia menggunakan internet melalui perangkat komputer, laptop atau perangkat *mobile*. Internet telah menjadi kebutuhan dasar orang saat ini, termasuk penggunaan aplikasi perambah dalam berselancar di dunia maya. Banyak didapati penyedia aplikasi *in silico* yang memberikan akses fitur melalui perambah internet. Salah satunya adalah pusat bioinformatik ZBH Universität Hamburg yang telah berevolusi tampilan dan menaikkan jumlah fitur aplikasi yang ditawarkan. Hal penting yang perlu diingat adalah semua penyedia aplikasi membuat batasan penggunaan untuk memberikan kesempatan yang sama bagi calon pengguna lainnya dan tidak dinyatakan secara jelas dan eksplisit mengenai pengelolaan dan kerahasiaan data yang telah diperoleh dari pengguna.

Protease SARS-CoV-2 dan senyawa golongan flavonoid terpilih menjadi studi kasus dalam pemanfaatan JAMDA, suatu aplikasi *docking* protein-ligan berbasis perambah. Terdapat lebih dari puluhan ribu senyawa golongan flavonoid yang telah berhasil diidentifikasi dan direkam dalam basis data PubChem. Golongan senyawa ini banyak diperoleh dari tanaman yang merupakan sumber terbesar dalam penemuan obat. Protease SARS-CoV-2 adalah satu dari sekian banyak protein target untuk menemukan obat COVID-19 yang hingga saat ini tetap menjadi tren topik penelitian dunia. Selain untuk mengenalkan kemudahan dalam melakukan *docking*, harapan yang ingin dicapai adalah memperbanyak partisipasi pengguna untuk menemukan obat secara virtual menggunakan metode *in silico* berbasis perambah.

2. Literatur Review

Berikut kajian literatur yang mendasari diperlukannya prosedur *in silico* berbasis perambah dan studi kasus untuk pengembangan obat yang mudah dilakukan, menjadi informasi ilmiah yang berguna dan berkontribusi secara tidak langsung dalam big data.

2.1. Big Data Molekul dan Makromolekul

Basis data ilmiah akan terus bertambah seiring pertumbuhan jumlah publikasi di era dunia maya yang tidak terbatas. Data-data seperti molekul baru yang berhasil diisolasi, disintesis dan diidentifikasi struktur kimianya dan/atau makromolekul protein yang dilaporkan, diunggah dan diakses yang menjadi sumber *big data* molekul-makromolekul. Basis data molekul ZINC15, PubChem dan protein data bank RCSB sudah dapat mewakili berapa besar jumlah *big data* tersebut. Bayangkan jika 110 juta molekul PubChem digabungkan dengan 230 juta molekul ready-to-dock atau 750 juta molekul yang bisa diperoleh dalam basis data ZINC15, seberapa besar big data yang dihasilkan setelah melalui tahapan menghilangkan molekul yang identik. Hal yang sama dapat dilakukan pula untuk basis data protein data bank RCSB dengan *sequence* data bank UniProt. Shaker et al [2] menyebutkan bahwa basis data BindingDB, ChemBridge dan Asimex juga dapat menjadi sumber data molekul untuk skrining virtual.

Persamaan persepsi istilah yang digunakan dalam *big data* menjadi penting untuk mendeskripsikan apa yang dimaksud [1]. Harmonisasi beberapa istilah terkait struktur kimia telah diaplikasikan dalam berbagai basis data molekul, seperti nama IUPAC, SMILES, InChI untuk mendeskripsikan struktur dua dimensi molekul namun masih banyak istilah lainnya yang perlu disepakati definisi dan kegunaannya dalam *big data*. Rifaioğlu et al [1] mencontohkan beberapa diantaranya adalah molekul kecil, senyawa, zat kimia, senyawa bioaktif, ligan dan obat. *Big data* molekul dan makromolekul perlu menentukan kriteria baku informasi yang harus dimiliki untuk menghindari adanya duplikasi dan akhirnya akan tercipta *big data* dunia yang universal.

2.2. Metode *in silico*

Terdapat beberapa metode *in silico* yang dikenal diantaranya metode berbasis ligan yang dilakukan melalui pendekatan kemiripan struktur, kesamaan farmakofor dan hubungan kuantitatif struktur aktivitas. Metode berbasis struktur diantaranya adalah penentuan protein target, memprediksi *binding site*, *docking* molekuler, *docking* berbasis fragmen dan dinamika molekuler. Umumnya yang sering digunakan adalah penambatan molekul berbasis protein target dikarenakan makromolekul target dapat diperoleh baik melalui basis data yang telah tersedia atau menggunakan teknik homologi. Protein target juga dapat diperoleh dari mesin prediksi khusus untuk ini seperti SwissTargetPrediction [1]–[3].

2.3. Protease SARS-CoV-2

Zhang et al [4] menjelaskan bahwa SARS-CoV-2 tersusun dari 4 protein struktural, dimana pada protein membran terdapat protein penciri virus SARS-CoV-2 untuk varian alfa, beta, delta dan gamma. Protease serin transmembrane 2 (TMPRSS2) merupakan salah satu protein penciri untuk SARS-CoV-2 varian beta. Protease ini berfungsi memutuskan ikatan polipeptida pada protein S virus dan menghasilkan subunit S1 dan S2 yang bertanggung jawab dalam fusi antara *envelope* virus dan membran sel host. Protease utama SARS-CoV-2 (M^{pro}) merupakan salah satu target yang lebih banyak digunakan dalam penemuan obat COVID-19. Protease utama M^{pro} dikenal pula sebagai protease 3C-like (3CL^{pro}) atau protein non-struktural 5 (nsp5) yang esensial untuk replikasi virus dan mempunyai peran dalam pembelahan proteolitik virus di 11 tempat berbeda. Protein target SARS-CoV-2 lainnya

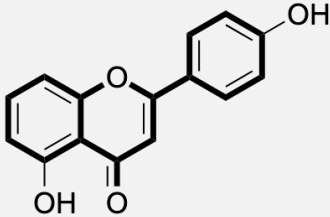
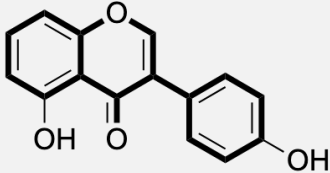
adalah protease papain-Like (PL^{pro}), polimerase RNA yang tergantung RNA (RdRp), protein helikase 5'-to-3' (nsp13). Protein non-struktural (nsp3) atau makrodomain SARS-CoV-2 (7bf6) memainkan peran penting dalam pengaturan respons imun inang untuk mengenali dan menghilangkan asam amino tempat ribosilasi ADP pascatranslasi terjadi selama infeksi SARS-CoV-2 [5], [6].

3. Metode

Penelitian ini telah dilakukan pada rig MacBook Pro keluaran Mid-2012 dengan spesifikasi MacOS Mojave, prosesor 2,9 GHz Intel Core i7 dan ram 16 GB. Aplikasi lokal yang telah digunakan adalah miniconda 3 versi 4.10.3, OpenBabel versi 3.1.0, PyMOL versi 2.3.4 dan PLIP versi 2.2.1 dengan perambah Firefox versi terbaru. Instalasi semua aplikasi lokal berbasis pada miniconda-python sehingga dapat dilakukan pada semua platform sistem operasi komputer atau laptop seperti MacOS, Windows dan Linux. Aplikasi daring yang telah dimanfaatkan adalah JAMDA, PoseView, DoGSiteScorer dan ketiganya dapat diakses pada <https://proteins.plus/>. Basis data RCSB dan PubChem secara berurutan dapat diakses pada <https://www.rcsb.org/> dan <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Makromolekul target (dalam basis data RCSB format pdb/cif) yang telah dipilih dan digunakan adalah lima protease SARS-CoV-2 dengan kode 7aeh, 7aga, 7ak4, 7bf6 dan 7k0e dengan molekul uji senyawa golongan flavonoid (dalam basis data PubChem format sdf) yang telah diunduh sebanyak 45 senyawa (Tabel 1), ditambah 5 senyawa *native* sehingga total ligan uji 50 senyawa dan berkas makromolekul dan ligan telah dipastikan memiliki konformasi tiga dimensi. Berikut prosedur yang digunakan: prosedur instalasi aplikasi lokal, prosedur preparasi protein target 7ak4, prosedur prediksi *binding site pocket* (DoGSiteScorer) dan kesejajaran konformasi 3D protein target, prosedur penggabungan ligan uji, prosedur penggunaan JAMDA, prosedur prediksi interaksi ligan protein menggunakan PoseView dan PLIP.

Tabel 1. Rangka Struktur Ligan Uji Golongan Flavonoid

Rangka Struktur Flavonoid	Senyawa Uji
	<i>2''-Acetyastragalin (L-41), 6''-O-Acetyastragalin (L-42), Abyssinone I (L-06), Albanin C (L-11), Amoridin (L-16), Amorinin (L-17), Apigenine 7-rhamnoside (L-20), Apigenine 7-xyloside (L-21), Aquileidine (L-23), Arthraxin (L-24), Artobioxanthone (L-25), Artochamin E (L-27), Artocommunol CB (L-28), Artocommunol CD (L-29), Artomunoxanthentrione (L-30), Artonin E (L-36), Artonin K (L-37), Artonin L (L-38), Artonin T (L-39), Astragalin (L-43), Atalantoflavone (L-45), Isomodulistin (L-35), Racemoflavone (L-49), Rubraflavone C (L-40)</i>
	<i>Alpinumisoflavone (L-13), Anagyroidisoflavone A (L-15), CHEBI:169195 (L-46), CHEMBL549827 (L-31), 3-O-Demethylamorphenin (L-32), Erysenegalensein I (L-47), Erysenegalensein L (L-48), Erysubin B (L-33), 11-Hydroxy Amorphispironone (L-34)</i>
Tipe Lainnya	<i>Aceronidin (L-07), Acumitin (L-08), Adunctin E (L-09), Albafuran A (L-10), Alphitonin (L-12), Ambanol (L-14), Amurensisin (L-18), Andiol A (L-50), Antiarone K (L-19), Apiocarpin (L-22), Artocarpol J (L-26), Astragaluquinone (L-44)</i>

3.1. Instalasi Aplikasi Lokal OpenBabel, PyMOL, PLIP

Instalasi miniconda 3 menggunakan installer di <https://repo.anaconda.com/miniconda/>, instalasi aplikasi lokal membutuhkan koneksi internet dan dilakukan melalui jendela terminal atau cmd miniconda menggunakan perintah berikut (tanpa tanda kutip):

- “conda install -c conda-forge openbabel=3.1.0”,
- “conda install -c tpeulen pymol-open-source=2.4.0”,
- “conda install -c conda-forge plip=2.2.1”

3.2. Preparasi Protease SARS-CoV-2 7ak4

Buka PyMOL dan pilih perintah Get PDB... dari menu File, ketikkan 7ak4 dan klik Download, klik struktur ligan *native* (tampak mencolok karena berbeda dengan tampilan struktur protein), pilih extract object kemudian new melalui tombol A di sebelah kata (sele), selanjutnya pilih Export Molecule...:

- untuk ligan *native*, pilih obj01 pada kolom selection, tentukan folder tempat untuk penyimpanan berkas, beri nama berkas misal CB1 dan pilih MDL SD (*.sdf *.mol) untuk ekstensi yang digunakan kemudian klik Save.
- untuk makromolekul, pilih 7ak4 pada kolom selection, tentukan folder tempat untuk penyimpanan berkas, beri nama berkas misal 7ak4 dan pilih PDB (*.pdb *.pdb.gz) untuk ekstensi yang digunakan kemudian klik Save.

3.3. Penggabungan Berkas Ligan Uji

Buat folder-target dan arahkan terminal atau cmd miniconda berada di folder-target, letakkan lima atau semua berkas ligan yang akan digabungkan dalam folder-target, buat folder-hasil dan folder-selesai dalam folder-target, gunakan perintah berikut (tanpa tanda kutip) “obabel *.sdf -O folder-hasil/klp-0X.sdf” dimana X merupakan angka tertentu atau ketikkan perintah “obabel *.sdf -O folder-hasil/ligan.sdf” jika ingin menggabungkan semua ligan, pindahkan berkas yang telah diproses ke dalam folder-selesai dan untuk kelompok berikutnya, letakkan 5 berkas ligan target lainnya dalam folder-target dan lakukan proses ini secara berulang sehingga ke-50 ligan telah digabung menjadi 10 kelompok berkas ligan.

3.4. Kesejajaran 5 Protease SARS-CoV-2 dan Prediksi *Binding Site Pocket*

- Menentukan kesejajaran konformasi 3D lima protease SARS-CoV-2. Buka PyMOL, load semua protein target, ubah nama setiap protein 7aeh, 7aga, 7ak4, 7bf6 dan 7k0e secara berturut-turut menjadi 01, 02, 03, 04, dan 05, gunakan perintah berikut (tanpa tanda kutip) secara berurutan pada kolom cmd PyMOL> “align 02, 01”, “align 03, 01”, “align 04, 01”, dan “align 05, 01”.
- Menentukan *binding site pocket*. Buka perambah dan ketikkan proteins.plus kemudian tekan enter, ketikkan kode protein target selain 7ak4 pada kolom pencarian kemudian tekan enter atau unggah berkas protein 7ak4 dengan ekstensi PDB dan berkas ligan CB1 dengan ekstensi SDF hasil preparasi sebelumnya dan klik Go, klik tombol create pocket di bawah gambar struktur native, pilih DoGSiteScorer dengan klik tombol DoGSiteScorer, pilih gambar struktur kimia ligan target yang sesuai (direkomendasikan pada rantai A jika terdapat lebih dari satu rantai) untuk penentuan binding site pocket, klik tombol Calculate, dan unduh hasil dengan klik tombol Download.

3.5. Penambatan Molekul Menggunakan JAMDA

Buka perambah dan ketikkan proteins.plus kemudian tekan enter, ketikkan kode protein target selain 7ak4 pada kolom pencarian kemudian tekan enter atau unggah berkas protein 7ak4 dengan ekstensi PDB dan berkas ligan CB1 dengan ekstensi SDF hasil preparasi sebelumnya dan klik Go, pilih JAMDA dengan klik tombol JAMDA, pilih gambar struktur kimia ligan target yang sesuai (direkomendasikan pada rantai A jika terdapat lebih

dari satu rantai) untuk penentuan Binding Site, unggah file berkas ligan hasil penggabungan sebelumnya melalui tombol dengan gambar ikon disk unggah, pilih 5 ligan yang akan diujikan dan lakukan hal ini terus menerus hingga semua ligan telah diujikan seluruhnya, untuk opsi lanjutan, pilih high untuk tingkatan presisi JAMDA, opsi lainnya dibiarkan terpilih secara bawaan dimana volume grid komputasi mencakup setidaknya 1150 Å³ berdasarkan ligan referensi yang dipilih, klik tombol Calculate untuk memulai docking protein ligan JAMDA, dan unduh hasil dengan klik tombol Download.

3.6. Prediksi Interaksi Ligan Protein menggunakan PoseView dan PLIP

- PoseView, buka perambah dan ketikkan proteins.plus kemudian tekan enter, unggah berkas protein pertama dengan ekstensi PDB dan ligan pertama dengan ekstensi SDF hasil docking JAMDA untuk ligan target yang terbaik dan klik Go, pilih PoseView dengan klik tombol PoseView, pilih gambar struktur kimia ligan target yang sesuai, klik Calculate, dan unduh hasil (bisa berupa png, svg atau pdf).
- Preparasi berkas untuk pengujian dengan PLIP. Buka PyMOL, load ligan pertama yang digunakan pada poin (1), lakukan Export Molecule... dan simpan sebagai berkas berekstensi PDB, bersihkan layar PyMOL dengan cara pilih Reinitialize (Everything), load protein dan ligan pertama pada poin (1) yang kesemuanya berekstensi PDB, lakukan Export Molecule... dan simpan sebagai berkas berekstensi PDB, buka berkas hasil penggabungan dengan aplikasi text editor, hapus semua baris yang mengandung kata (tanpa tanda kutip) "CONNECT", lakukan simpan berkas.
- PLIP, buka terminal atau cmd miniconda, gunakan perintah berikut (tanpa tanda kutip): "plip -f namaberkaspadapoin(2).pdb -o folder-hasil-0X -vptyx" dimana X merupakan angka tertentu.

3.7. Analisis Data

Skor hasil JAMDA dikonversi menjadi rasio skor dengan menggunakan skor *native* sebagai bilangan penyebut dan dihitung nilai rerata rasio skor dari setiap ligan yang diujikan.

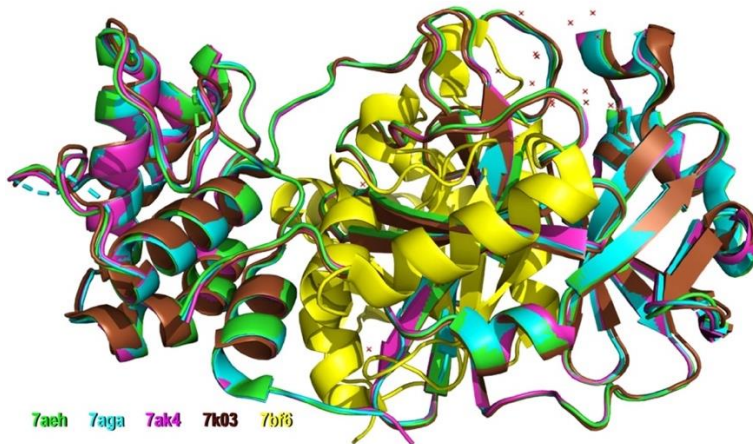
4. Hasil dan Pembahasan

Kelima struktur 3D protease SARS-CoV-2 yang dipilih, telah dilaporkan oleh empat kelompok peneliti yang berbeda. Penilaian kesejajaran konformasi dilakukan untuk melihat tingkat kemiripan struktur protein target ([Gambar 1](#)). Hal ini ditujukan untuk melihat hubungan interaksi protein ligan uji dibandingkan dengan *native* terhadap konformasi protein target secara keseluruhan setelah dilakukan prediksi interaksi protein ligan. [Gambar 1](#) menunjukkan bahwa protein 7bf6 memiliki bentuk, volume dan konformasi yang berbeda dibandingkan dengan keempat protein target lainnya. Selain ditampilkan secara visual, nilai RMSD kesejajaran protein 7bf6 terhadap protein 7aeh lebih dari 2 Å.

Hasil penilaian kesejajaran PROMALS3D memperlihatkan hasil yang sama (data tidak disajikan). Protein 7bf6 memiliki urutan asam amino yang berbeda dibandingkan dengan keempat protein lainnya dengan jumlah residu yang lebih kecil, tersusun dari 173 asam amino. Hal ini mempengaruhi konformasi 3D dari protein tersebut. Kelima protein telah memenuhi kriteria awal sebagai protein target, diantaranya adalah telah diukur secara kristalografi x-ray dengan resolusi kurang dari sama dengan 2,5 Å.

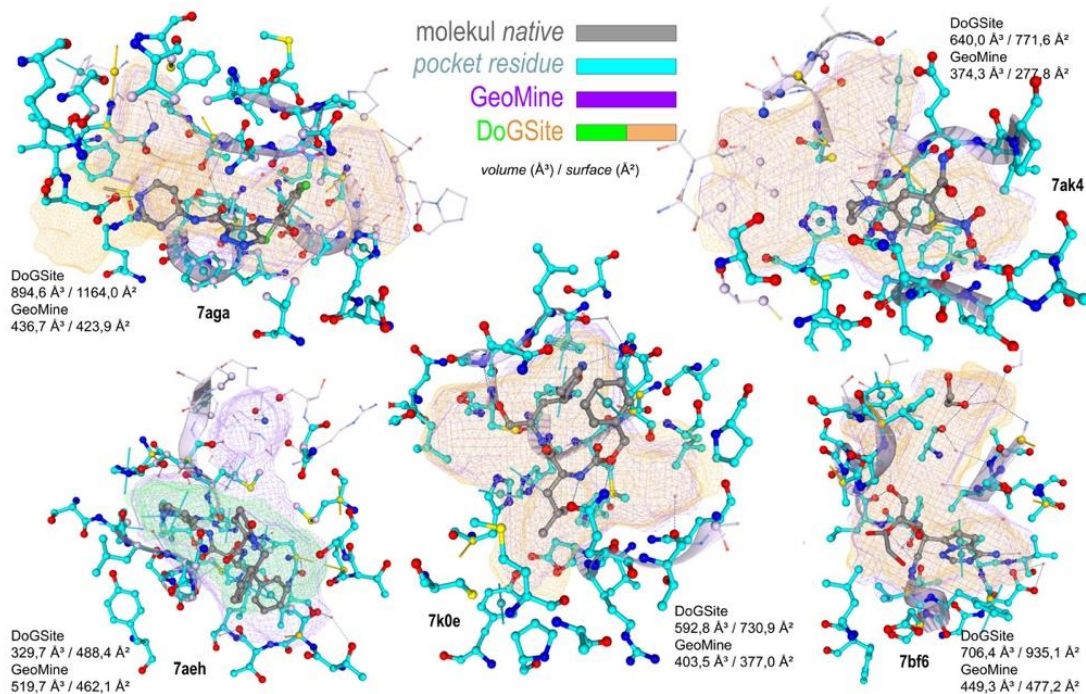
Hal menarik yang perlu diperhatikan adalah kesejajaran konformasi ruang dan urutan asam amino keempat protein target hampir menyerupai namun memiliki ligan *native* yang berbeda. Keberadaan *native* memberikan hasil prediksi volume dan luas permukaan *binding site pocket* yang berbeda, [Gambar 2](#). Dugaan yang bisa ditegakkan dalam hal ini bahwa

konformasi residu aktif dipengaruhi oleh ligan *native* yang terikat dan berinteraksi. Informasi ini sangat penting dalam menetapkan suatu simpulan mengenai afinitas ikatan ligan yang diujikan dalam penambatan molekul harus ditambahkan pada hasil keterangan berikut “ekivalen *native* x” dimana x adalah nama dari molekul *native* dalam protein target. Selain itu, penambatan molekul terbalik dengan protein sejenis (**Gambar 1**) dengan *native* yang berbeda diperlukan untuk menguatkan postulat suatu senyawa dapat diprediksi memiliki afinitas ikatan yang lebih baik dan diharapkan memberikan aktivitas biologis yang tidak berbeda jauh dengan hasil *in silico* dan lebih aktif dibandingkan senyawa pembanding pada pengujian laboratorium sesuai hasil komputasi.



Gambar 1.

Konformasi 3D Protease SAR-CoV2 berdasarkan Nilai Kesejajaran (RMSD; resolusi, Å) 7aga (0,222; 1,68), 7ak4 (0,293; 1,63), 7k0e (0,606; 1,90) dan 7bf6 (10,359; 2,15) terhadap konformasi 7aeh dengan resolusi pengukuran kristalografi x-ray 1,30 Å

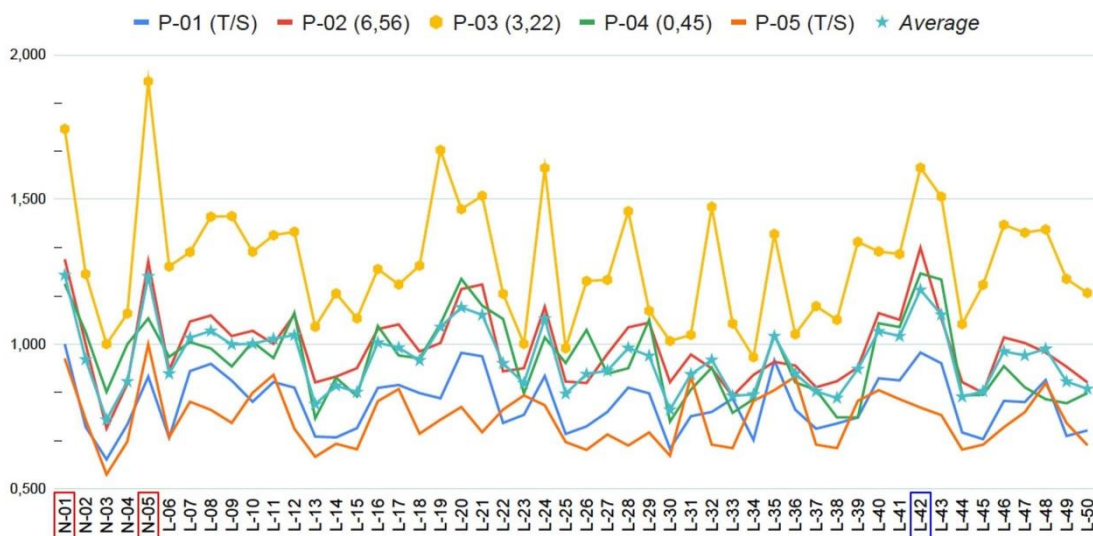


Gambar 2. Binding Site Pocket DoGSite dan GeoMine protease SAR-CoV-2 dimana volume (Chimera) dan luas permukaan polar (PubChem) *native* secara berurutan untuk 7aeh, 7aga, 7ak4, 7bf6 dan 7k0e adalah 441,2; 313,6; 184,8; 232,2; dan 376,6 Å³ dan 112; 98,9; 138; 150; dan 180 Å².

Gambar 2 menunjukkan besaran volume dan luas permukaan *binding site pocket* setiap protein target. Terdapat 2 tipe prediksi yang diperoleh dari aplikasi daring Proteins Plus, yaitu pertama *pocket* berbasis ligan, GeoMine dan kedua kalkulasi *pocket* berbasis

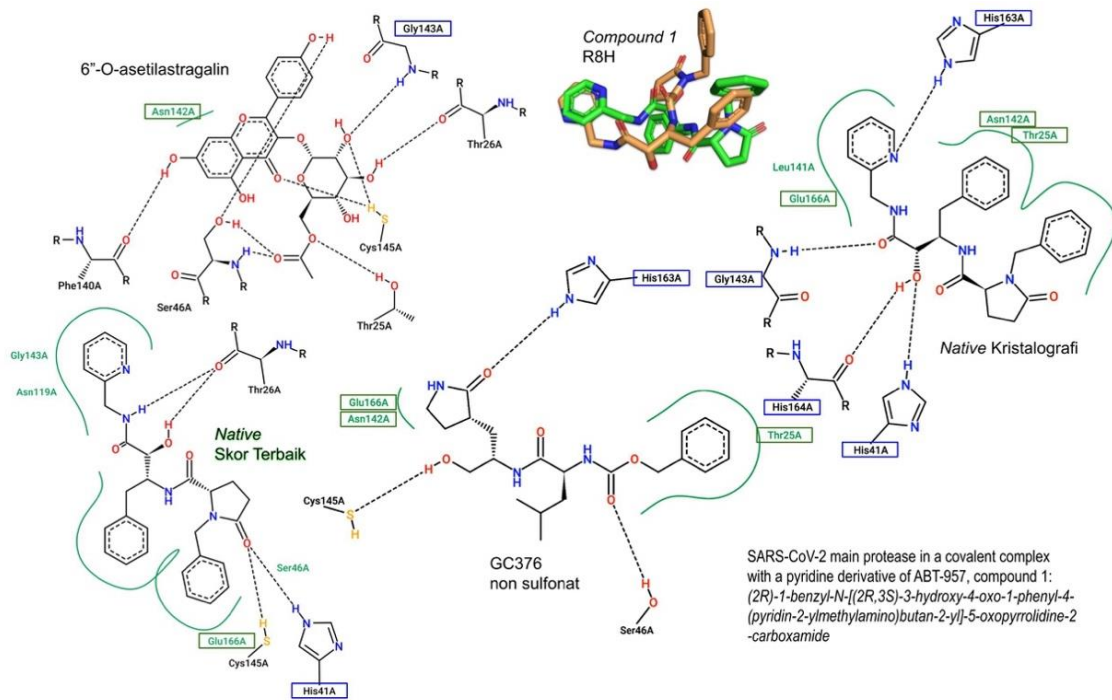
druggability rantai protein yang dipilih dan ligan, DoGSite. Volume senyawa *native* keempat protein target selain 7aeh memiliki nilai kurang dari volume hasil prediksi GeoMine dan DoGSite namun konformasi *native* memperlihatkan bahwa tidak semua posisi atom dan ikatan *native* berada seluruhnya dalam *binding site pocket*. Hal ini menunjukkan bahwa hanya sebagian dari keseluruhan bagian struktur 3D *native* yang berinteraksi dengan residu protein target. Fenomena yang sama akan diperoleh untuk ligan lainnya terutama konformasi 3D, volume dan luas permukaan ligan lebih dari yang dimiliki oleh *binding site pocket* protein target. Kedekatan besaran volume dan luas permukaan ligan dengan *pocket* target akan memberikan hasil komputasi dan prediksi interaksi ligan protein yang lebih baik dibandingkan jika volume dan luas permukaan ligan lebih dari nilai yang dipunyai *pocket*. Terlebih jika *pocket* berada sangat dalam protein target dan tidak dekat dengan permukaan protein.

Data hasil *docking* JAMDA untuk 50 ligan dengan 5 protein target yang telah diperoleh dalam waktu 7,5 jam ketika dikerjakan secara single tab dan 1,5 jam untuk maksimal lima (multi) tab ditunjukkan dalam **Gambar 3**. Sebagian besar ligan memiliki rasio skor sama dengan atau lebih dari 1,0 untuk protein 7ak4. Hal ini mengindikasikan bahwa skor JAMDA ligan lebih baik dibandingkan skor *native*. Rasio skor ligan uji untuk keempat protein target lainnya berfluktuasi dan dominan tidak berada di atas rasio 1,0. Rerata rasio skor tertinggi ditemukan pada *native* protein 7aeh (N-01), 7k0e (N-05) dan 6"-O-asetilastragalin (L-42).



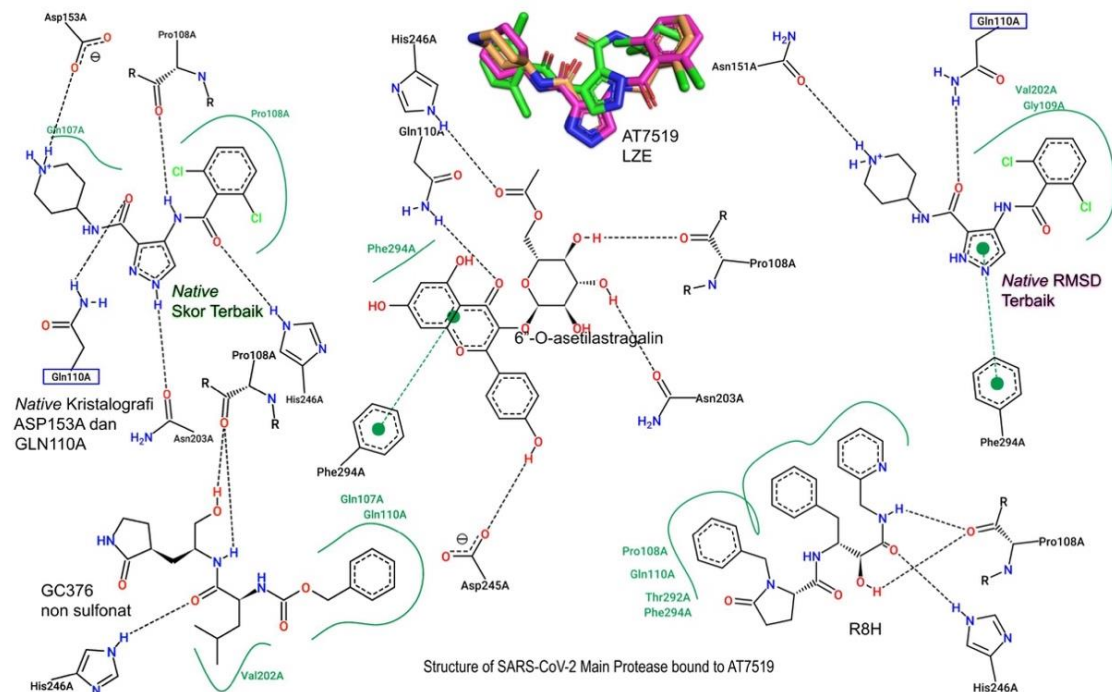
Gambar 3. Distribusi Rasio Skor JAMDA Ligan Uji Golongan Flavonoid (L) dan *native* (N)

Skor JAMDA untuk N-01 dan N-05 tinggi di semua protein target dibandingkan dengan ligan lainnya (**Gambar 4**). Salah satu penyebabnya adalah keleluasaan ruang gerak ligan yang memiliki 10-12 ikatan yang dapat diputar, 3-6 kali lebih banyak dari yang dimiliki *native* lainnya dan bahkan hingga 12 kali untuk beberapa ligan uji. Ligan tipe ini memiliki keciri-khasan tersendiri untuk *binding site* protein targetnya karena ruang *pocket* telah menyesuaikan dengan volume, luas permukaan dan konformasi terbaik *native*, sama halnya untuk contoh *native* lain seperti taxol pada protein targetnya. Selain itu, tidak akan ada ligan yang dapat memiliki afinitas lebih baik darinya jika ligan trget tidak memiliki kedekatan inti struktur, volume, luas permukaan dan konformasi dengan *native* tipe ini. Ligan 6"-O-asetilastragalin (L-42) memiliki volume dan luas permukaan polar secara berurutan sebesar 398 Å³ dan 192 Å² yang cenderung menyerupai dengan N-01 dan N-05.



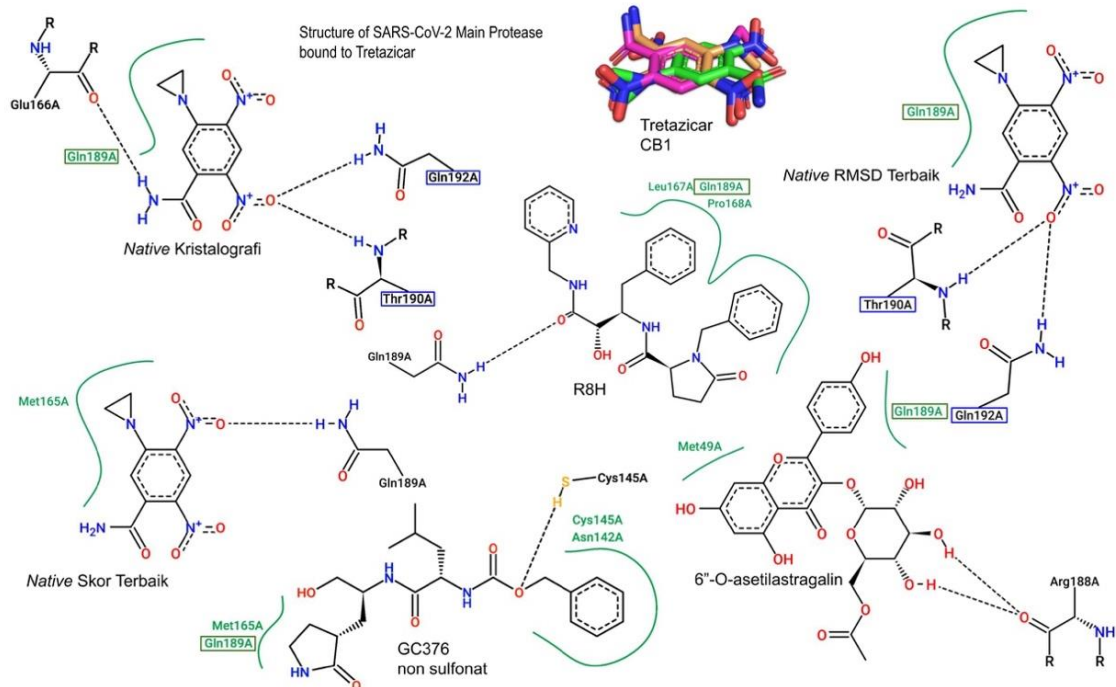
Gambar 4. Interaksi Ligan Protein *native* (R8H), N-05, dan L-42 pada Protein 7aeh

Terdapat 2 tipe interaksi pada protein 7aeh untuk *native* baik konformasi kristalografi dan hasil *docking*, N-05 dan L-42, yaitu interaksi hidrofobik (THR25, ASN142, GLU166) dan ikatan hidrogen (HIS41, GLY143, HIS164) yang berbeda dengan yang dilaporkan oleh Readhead et al [7] bahwa ikatan hidrogen terjadi pada SER144, CYS145, dan HIS41, kecuali GLY143. Konformasi molekul kristalografi *native* dan hasil penambatannya menunjukkan ketidaksejajaran seperti yang didapati pula pada protein target 7k0e. Hasil *docking* JAMDA juga memperlihatkan bahwa kedua *native* tersebut tidak diperoleh data RMSD (**Gambar 3**).



Gambar 5. Interaksi Ligan Protein *native* (LZE), N-01, N-05, dan L-42 pada Protein 7aga

Native, N-01, N-05, dan L-42 tidak memiliki interaksi ligan protein yang sama pada protein 7ak4 (**Gambar 5**). Hanya GLN119 yang teridentifikasi memiliki interaksi ikatan hidrogen pada *native* dengan skor terbaik menggunakan prediksi PoseView. Posisi ruang 3D dari *native* hasil *docking* skor terbaik (**Gambar 5**, molekul berwarna hijau) berada pada koordinat yang sama dengan *native* kristalografi namun dengan orientasi yang berbeda. Sebaliknya, konformasi hasil penambatan molekul untuk RMSD terbaik (**Gambar 5**, molekul berwarna merah muda) memiliki kemiripan letak antar atom molekul dengan *native* kristalografi. Demikian pula untuk protein 7ak4 dan 7bf6 diperoleh hasil yang sama.



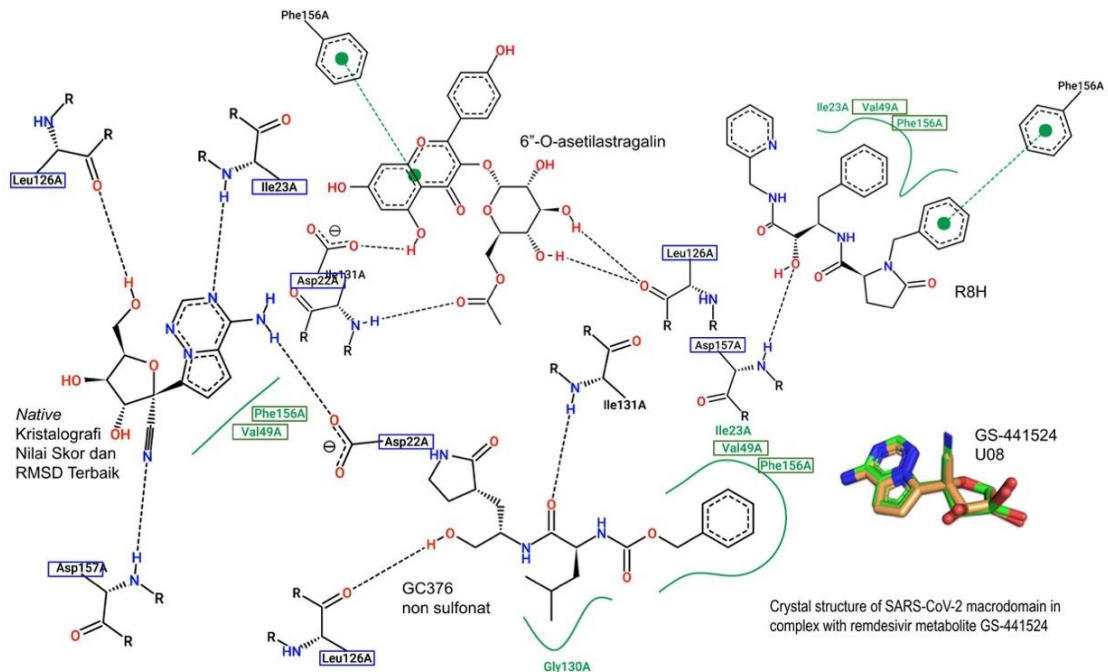
Gambar 6. Interaksi Ligan Protein *native* (tretazicar), N-01, N-05, dan L-42 pada Protein 7ak4

Jumlah interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen untuk tretazicar (*native*) baik kristal dan hasil *docking* dengan nilai RMSD terbaik diperoleh hasil yang sama, yaitu GLN189, THR190, dan GLN192. Menariknya, hasil *docking native* dengan skor terbaik tidak memiliki kesamaan interaksi dengan keduanya (**Gambar 6**). Ligan N-01, N-05 dan L-42 mempunyai interaksi hidrofobik GLN189 yang sama dengan *native*. Besarnya nilai volume dan luas permukaan molekul N-01, N-05 dan L-42 namun masih memenuhi *pocket* protein 7ak4 memberikan jumlah prediksi interaksi yang setidaknya sama (L-42) dan lebih banyak (N-01 dan N-05). Hal ini berbanding terbalik dengan *native* yang hanya memiliki 3 interaksi ligan protein.

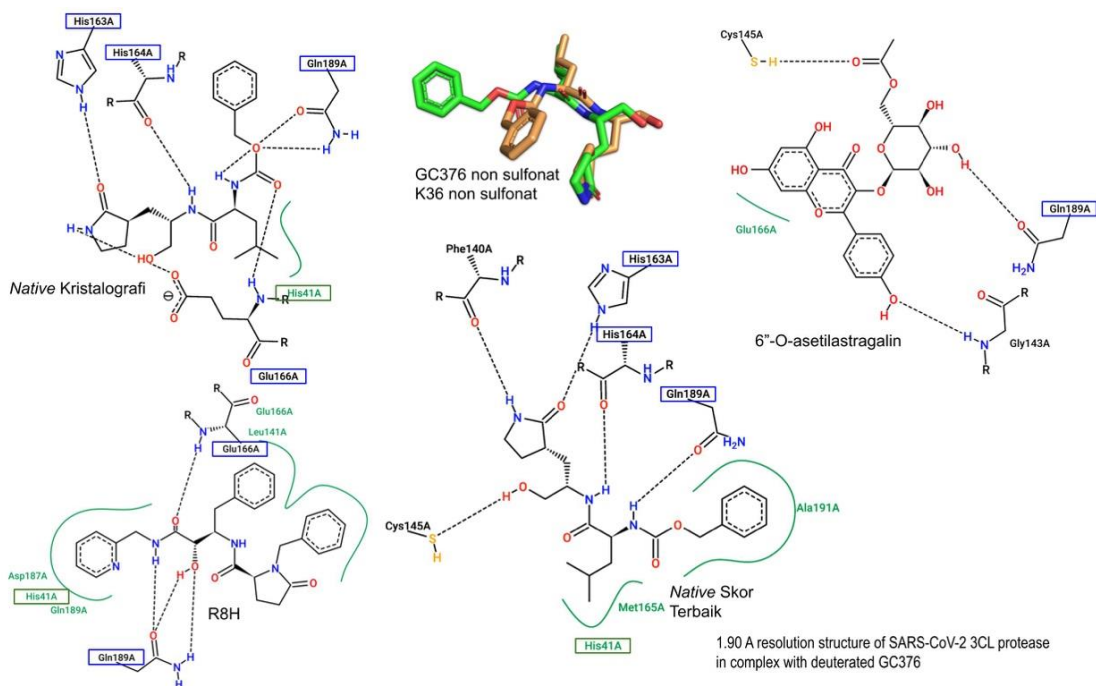
Residu yang berperan dalam interaksi kedua ligan (N-01 dan L-42) dengan protein 7bf6 (**Gambar 7**) diantaranya adalah ASP22, ILE23, LEU126, ASP157 (ikatan hidrogen) dan VAL49, PHE156 (interaksi hidrofobik). Ikatan hidrogen ligan protein melibatkan HIS163, HIS164, GLU166 dan HIS41 (interaksi hidrofobik) untuk protein 7k03 (**Gambar 8**). Dampalla et al., (2021) melaporkan bahwa residu yang terlibat dalam ikatan hidrogen ligan GC376 non sulfonate dengan protein diantaranya adalah HIS41, PHE140, CYS145, HIS163, HIS164, GLU166, dan GLN189. Hal ini memperlihatkan bahwa hasil penambatan molekul melalui prediksi interaksi telah menyerupai kondisi sebenarnya.

Aplikasi PLIP telah memprediksi keberadaan molekul air dalam interaksi ligan protein yang ditunjukkan dalam **Tabel 2**. Terutama pada protein 7bf6, molekul 6''-O-asetilastragalin

memiliki skor terbaik diduga karena adanya kesamaan interaksi jembatan air (*water bridge*) pada air urutan 358 dengan *native* namun skor tinggi ini tidak untuk N-05 meskipun terdapat 2 molekul air yang terlibat, bahkan skor N-01 menempati urutan kedua setelah L-42 dimana tidak didapati kesertaan air dalam interaksi ligan protein. Selain nilai RMSD, kesamaan jumlah dan tipe interaksi antara *native* kristal dan hasil *docking* disarankan menjadi parameter validasi sistem penambatan molekuler yang baik. Prediksi PLIP digunakan untuk melengkapi hasil prediksi PoseView yang keduanya mempunyai baku pengaturan prediksi yang berbeda.



Gambar 7. Interaksi Ligan Protein *native* (GS-441524), N-01, N-05, dan L-42 pada Protein 7bf6



Gambar 8. Interaksi Ligan Protein *native* (GC376 non sulfonat), N-01, dan L-42 pada Protein 7k0e

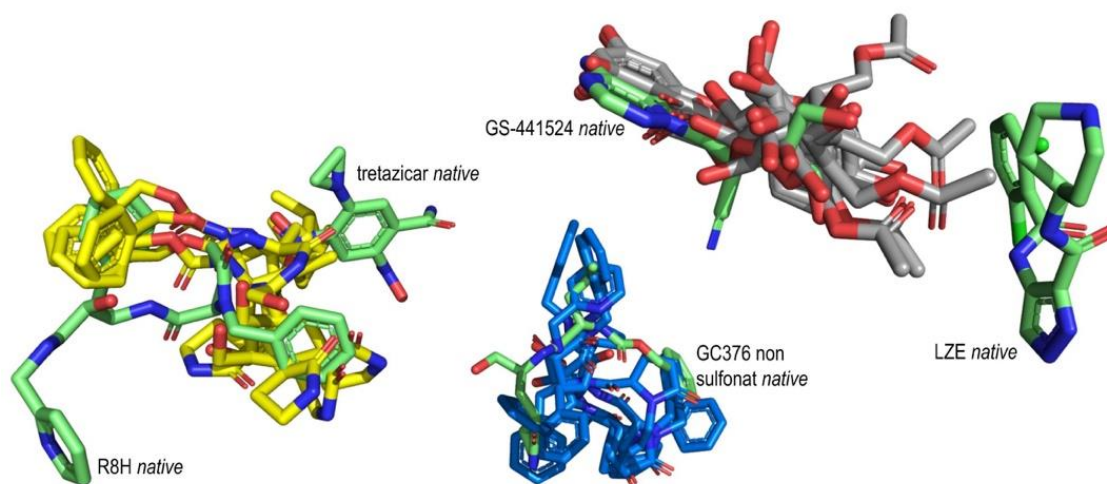
Tabel 2. Nomor Urut Molekul Air yang Terlibat dalam Interaksi Jembatan Air (*water bridge*) berdasarkan Hasil Prediksi PLIP

Kode protein	Native kristal	Native docked	L-42	GC736	N-05	N-01
7aeh	653	-	-	-	632	-(nd)
7aga	526, 682	-	-	-	-	-
7ak4	519	-	586, 662	586, 662	511, 586	586, 662
7bf6	358	358	358	347	358 , 361	-
7k0e	-	-	-	562	-(nd)	-

Keterangan nd = *native docked*

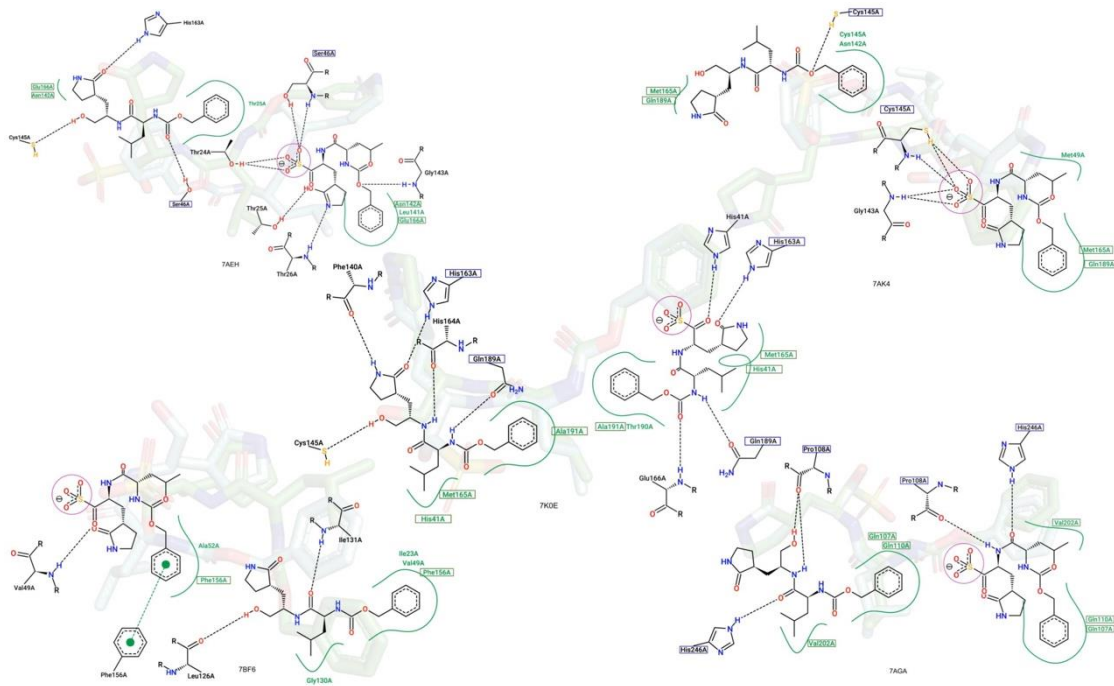
Ikatan yang dapat diputar pada molekul (*rotatable bond*) dan residu *pocket* merupakan faktor penentu konformer yang terbentuk selama penambatan molekuler. Hasil kesejajaran N-01 dan N-05 hasil JAMDA (**Gambar 9**) memberikan konformer dengan letak semua atom molekul yang berbeda. Lain halnya dengan L-42, variasi konformasi terjadi pada atom penyusun glikosida asetil bukan pada cincin benzen molekul. Basis data PubChem tidak akan menyediakan berkas struktur 3D untuk molekul yang memiliki jumlah ikatan yang dapat diputar sangat tinggi karena tidak diperoleh konformer tiga dimensinya.

Ada 2 struktur kimia *native* yang ditemukan untuk protein 7k0e, yaitu tipe sulfonat ditampilkan pada laman RCSB dan non sulfonat didapati pada berkas PDB hasil unduh dan basis data Proteins Plus. Berasal dari ketidaksesuaian ini, telah dilakukan penambatan molekuler ligan tipe sulfonat untuk kelima protein target dan hasil prediksi interaksi ligan protein seperti yang disajikan pada **Gambar 10**.

**Gambar 9.** Konformasi Ruang Kesejajaran hasil *docking* untuk *native* (hijau), N-01 (biru), N-05 (kuning) dan L-42 (abu-abu) semua protein target

5. Kesimpulan

Uji skrining *in silico* dapat dilakukan dalam satu laman aplikasi berbasis perambah, Proteins Plus single atau multi tab (paralel). JAMDA, aplikasi *docking* yang dapat digunakan secara cepat, mudah dan memiliki tampilan di sisi pengguna yang baik namun sangat tidak dianjurkan untuk menguji senyawa baru (novel) yang belum ada dalam basis data mana pun atau masih dalam pengajuan hak cipta dikarenakan faktor kerahasiaan data yang tidak dijamin oleh penyedia layanan gratis ini. Selain itu, terdapat aplikasi PoseView dan DoGSite yang dapat digunakan untuk mengetahui prediksi interaksi ligan protein dan letak *binding site pocket*.



Gambar 10. Interaksi Ligan Protein antara K36 sulfonat (GC376) dan non sulfonat dengan nilai skor JAMDA secara berurutan untuk protein 7aeh, 7aga, 7ak4, 7bf6, dan 7k0e adalah [-3,3042; -3,2741], [-3,2521; -2,2670], [-3,4402; -1,9107], [-2,8694, -2,5207], dan [-3,6680; -3,7175].

Referensi

- [1] A. S. Rifaioglu, H. Atas, M. J. Martin, R. Cetin-Atalay, V. Atalay, and T. Doğan, “Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: methods, tools and databases,” *Briefings in bioinformatics*, vol. 20, no. 5, pp. 1878–1912, 2019.
- [2] B. Shaker, S. Ahmad, J. Lee, C. Jung, and D. Na, “In silico methods and tools for drug discovery,” *Computers in biology and medicine*, vol. 137, p. 104851, 2021.
- [3] S. Ekins, J. Mestres, and B. Testa, “In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling,” *British journal of pharmacology*, vol. 152, no. 1, pp. 9–20, 2007.
- [4] Q. Zhang *et al.*, “Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy,” *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 6, no. 1, pp. 1–19, 2021.
- [5] X. Ni *et al.*, “Structural insights into plasticity and discovery of remdesivir metabolite GS-441524 binding in SARS-CoV-2 macrodomain,” *ACS medicinal chemistry letters*, vol. 12, no. 4, pp. 603–609, 2021.
- [6] D. D. Nguyen, K. Gao, J. Chen, R. Wang, and G.-W. Wei, “Unveiling the molecular mechanism of SARS-CoV-2 main protease inhibition from 137 crystal structures using algebraic topology and deep learning,” *Chemical science*, vol. 11, no. 44, pp. 12036–12046, 2020.
- [7] M. A. Redhead *et al.*, “Bispecific repurposed medicines targeting the viral and immunological arms of COVID-19,” *Scientific reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2021.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)