



UNIVERSITAS INDONESIA

MODIFIKASI (*1R,2R,3R,5S*)-(-)-*ISOPINOCAMPHEYLAMINE*
SEBAGAI INHIBITOR *M2 PROTON CHANNEL* PADA VIRUS
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 SECARA *IN SILICO*

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

RAHAYU HARGANINGTYAS

0706163281

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JULI 2011

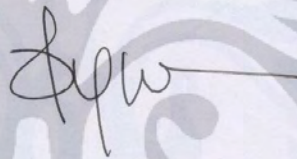
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Rahayu Harganingtyas

NPM : 0706163281

Tanda Tangan :



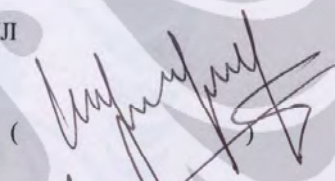
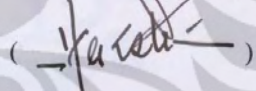
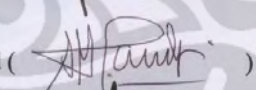
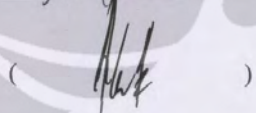
Tanggal : 6 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rahayu Harganingtyas
NPM : 0706163281
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : MODIFIKASI (1R, 2R, 3R, 5S)-(-)-
ISOPINOCAMPHEYLAMINE SEBAGAI
INHIBITOR M2 PROTON CHANNEL PADA
VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H1N1
SECARA *IN SILICO*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Prof.Dr.Usman Sumo FT ()
Penguji : Dr. Ir. A. Herry Cahyana ()
Penguji : Dra. Sri Handayani M.Biomed ()
Penguji : Dr. Arry Yanuar M.Si ()

Ditetapkan di :

Tanggal :

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi dengan judul MODIFIKASI(1R,2R,3R,5S)-(-)-ISOPINOCAMPHEYLAMINE SEBAGAI INHIBITOR M2 PROTON CHANNEL PADA VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 SECARA *IN SILICO* . Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

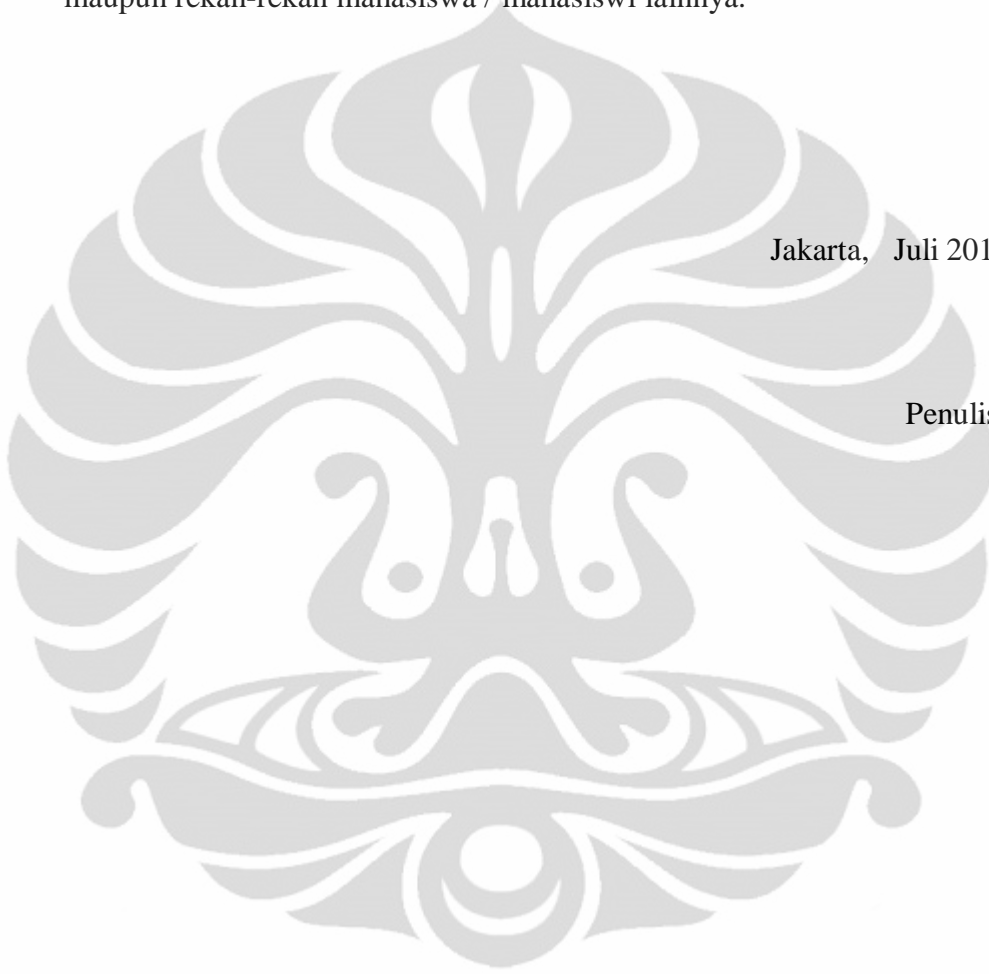
- (1) Prof. Dr. Usman Sumo Friend Tambunan, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini dan juga memberikan motivasi kepada penulis untuk menjadi manusia yang lebih baik
- (2) Dr. Ridla Bakri, Ph.D selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI, Ir. Widyastuti Samadi, M.Si selaku Koordinator Pendidikan, Dra. Tresye Utari, M.Si selaku Koordinator Penelitian, Prof. Dr. Sumi Hudiyono PWS selaku Kepala KBI Biokimia, dan untuk seluruh dosen departemen kimia atas pengajarannya selama penulis kuliah di Departemen Kimia FMIPA UI
- (3) Ibu dan Bapak tersayang, atas segala dorongan moril, materiil, dan terutama doa restu yang selalu mendampingi penulis dimanapun berada,. Mba angga dan Mas Joel atas segala supportnya.
- (4) Muhamad Nanda Pradipta atas segala bantuan dan supportnya kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Dan juga kesediaannya mendampingi penulis pada masa-masa berat dalam penyelesaian skripsi ini.
- (5) Teman satu lab bioinformatik: Riski Imaniastuti, Johannes Salim, Tirtana Prasetya atas diskusinya, kebersamaannya dalam beberapa bulan terakhir ini,
- (6) Senior- senior Bioinformatika : Kak Harry, Kak William, Kak Randy, Pak Idrus atas segala pengajaran, saran, diskusinya selama penulis menjalani penelitian ini.
- (7) Sahabat-sahabat selama penulis menjalani masa perkuliahan di Departemen Kimia ini: Prita, Mega, Yulinar , Ina, Eno, Nisa, Adli, Savitri untuk perjalanan hidup yang istimewa di Kimia, mulai nginep bareng, belajar bareng, belanja bareng. Terima kasih teman
- (8) Teman- teman kimia 2007 yang menyenangkan, Ikan, Awe, Rafi, Zetry, Rifan, Dante dan semuanya yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT membalas budi dan jasa semua pihak yang telah membantu terwujudnya penulisan Tugas Akhir ini. Penulis menyadari masih banyak kekurangan sehubungan dengan terbatasnya waktu, kemampuan, dan pengetahuan yang penulis miliki. Oleh karena itu, penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang sifatnya membangun demi perbaikan di masa yang akan datang.

Akhir kata besar harapan semoga penulisan ini bermanfaat bagi penulis maupun rekan-rekan mahasiswa / mahasiswi lainnya.

Jakarta, Juli 2011

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rahayu Harganingtyas
NPM : 0706163281
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

MODIFIKASI(1R, 2R, 3R, 5S)-(-)-ISOPINOCAMPHEYLAMINE SEBAGAI INHIBITOR M2 PROTON CHANNEL PADA VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 SECARA *IN SILICO*

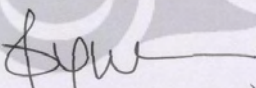
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 6 Juli 2011

Yang menyatakan


(.....)

ABSTRAK

Nama : Rahayu Harganingtyas
Program Studi : Kimia
Judul : Modifikasi (1R,2R,3R,5S)-(-)-Isopinocampheylamine sebagai Inhibitor M2 Proton Channel pada Virus Influenza A Subtipe H1N1 secara *in silico*

Pada tahun 2009, *flu babi* kembali menyerang berbagai negara di dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menetapkan wabah virus influenza A H1N1 sebagai pandemi global pada 11 Juni 2009. Setidaknya ada sekitar 18.449 orang di seluruh dunia yang meninggal akibat serangan virus ini. Kemudian pada tanggal 10 Agustus 2010 Badan Kesehatan Dunia (WHO) secara resmi mengumumkan pandemi flu babi di dunia telah berakhir dan berganti menjadi fase *post pandemic*. Fase *post pandemic* ini fase paling tepat untuk menemukan antiviral yang dapat mengatasi infeksi virus ini. Salah satu antiviral yang telah ada yaitu amantadine dan rimantadine dilaporkan telah mengalami resistansi. Oleh karena itu perlu ditemukan antiviral baru untuk menggantikan amantadine dan rimantadine sebagai inhibitor protein M2 channel virus influenza A H1N1. Belakangan dilaporkan bahwa senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine memiliki kemampuan untuk menghambat protein M2 channel virus influenza A H1N1. Pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine secara *in silico* untuk mendapatkan inhibitor yang lebih baik. Terhadap protein M2 channel, dilakukan *docking* dengan tiga inhibitor standar dan 52 inhibitor modifikasi, serta dilakukan *drug scan* terhadap modifikasi inhibitor. Hasil *docking* didapatkan 3 inhibitor modifikasi terbaik yang mempunyai afinitas ikatan dan potensi inhibisi yang lebih baik dibanding ligan standar. Berdasarkan analisa *drug scan*, inhibitor modifikasi mempunyai sifat farmakologi yang baik, ditunjukkan oleh nilai *drug likeness*, *drug score*, bioavailabilitas oral, dan toksisitas.

Kata Kunci : Influenza A H1N1, Inhibitor, Protein M2 channel, *Molecular Docking*

xiv+80 halaman : 18 gambar; 12 tabel

Daftar Pustaka : 61 (1990-2011)

ABSTRACT

Name : Rahayu Harganingtyas
Study Program : Chemistry
Topic : Modification of (1R, 2R, 3R, 5S)-(-)- Isopinocampheylamine as Inhibitors of M2 Proton Channel in Influenza A Virus Subtype H1N1 by Using Molecular Docking Approach

In 2009, swine flu attacked various countries in the world. World Organization (WHO) set a pandemic of influenza A H1N1 virus as a global pandemic on June 11, 2009. At least there are approximately 18,449 people worldwide who die from this virus attack. Then on August 10, 2010 World Health Organization (WHO) officially announced the swine flu pandemic in the world has ended and changed into post-pandemic phase. Post-pandemic phase is the most appropriate phase to find antiviral that can overcome the infection with this virus. One of the existing antivirals amantadine and rimantadine are reported to have experienced resistance. Therefore it is necessary to find new antiviral to replace amantadine and rimantadine as the M2 channel protein inhibitor of influenza A H1N1 virus. Later it was reported that compound (1R, 2R, 3R, 5S)-(-)- isopinocampheylamine have the ability to inhibit channel M2 protein of influenza A H1N1 virus. This research will be modified (1R, 2R, 3R, 5S)-(-)- isopinocampheylamine in silico to obtain better inhibitors. Against the M2 protein channel, performed three inhibitor docking with standard and 52 inhibitors modifications, and also done a drug scan for modifications inhibitor. Docking results obtained three best binding affinity of modifications inhibitor and its potency of inhibition is much better than standard ligands. Based on drug analysis scan, the inhibitor of modification has a good pharmacological properties, indicated by the value of drug-likeness, drug score, oral bioavailability, and toxicity.

Keyword : Influenza A Virus H1N1, M2 Protein Channel, Inhibitor, Molecular Docking
xiv+80 pages : 18 pictures; 12 tables
Bibliography : 61 (1990-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Virus Influenza.....	4
2.2 Virus Influenza H1N1 (<i>Swine Flu</i>)	5
2.3 Infeksi Virus Influenza A	6
2.4 Hemaglutinin (HA)	7
2.5 Neuraminidase (NA)	9
2.6 Protein Polymerase A (PA), Protein Polymerase B1 (PB1), dan Protein Polymerase B2 (PB2)	10
2.7 Protein M2 <i>Channel</i>	10
2.8 Protein NS1 dan NS2	12
2.9 Amantadine.....	12
2.10 Rimantadine	12
2.11 Isopinocampheylamine.....	13
2.12 <i>Drug Design</i>	14
2.13 Bioinformatika	15
2.13.1 Definisi	15
2.13.2 <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	15
2.13.3 Format GenBank Flatfile	15
2.13.4 Format FASTA	16

2.13.5 <i>Multiple Sequence Alignment</i>	16
2.13.6 <i>Comparative Modeling (Homology Modeling)</i>	17
2.13.7 <i>Molecular Modelling</i>	17
2.13.8 <i>Molecular Docking</i>	18
2.14 Prediksi Sifat Farmakologi Secara <i>In Silico</i>	18
3.METODE PENELITIAN	20
3.1 Alat dan Bahan.....	20
3.2. Lingkup Kerja	20
3.2.1. Preparasi Protein M2 <i>channel</i>	20
3.2.1.1 Pencarian Sekuen Protein M2 <i>channel</i> Virus H1N1.....	20
3.2.1.2 <i>Multiple Sequence Alignment</i>	20
3.2.1.3 Pencarian Struktur Tiga Dimensi.....	21
3.2.1.4 Pencarian Data PDB Struktur Tiga Dimensi M2 <i>channel</i>	21
3.2.1.5 Optimasi Geometri dan Minimasi M2 <i>channel</i>	21
3.2.2 Perancangan Struktur Tiga Dimensi non-adamantane Sebagai Ligan	21
3.2.2.1 Modifikasi Bentuk dari (1R,2R,3R,5S)-(-)- isopinocampheylamine.....	21
3.2.3 <i>Docking</i> Antara Ligan dengan Protein M2 <i>Channel</i>	22
3.2.4 Analisis <i>Docking</i>	22
3.2.4.1 Penentuan Konformasi Kompleks Protein-Ligan hasil <i>Docking</i>	22
3.2.4.2 Energi Ikatan dan Konstanta Inhibisi (Ki)	22
3.2.4.3 Ikatan Hidrogen	22
3.2.4.4 Residu Kontak	22
3.2.4.5 Analisis <i>Drug Scan</i>	23
3.2.4.6 Prediksi Toksisitas	23
4.HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1 Persiapan Protein M2 <i>Channel</i> Influenza A (H1N1)	24
4.1.1 Pencarian Sekuen M2 <i>Channel</i> Virus Influenza A (H1N1)	24
4.1.2 <i>Multiple Sequence Alignment</i>	24
4.1.3 <i>Homology modeling</i> dan Identifikasi <i>Template</i>	25
4.1.4 Visualisasi Sisi Aktif M2 <i>Channel</i>	25
4.1.5 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur Tiga Dimensi M2 <i>channel</i>	26

4.2 Persiapan Ligan.....	28
4.2.1 Penentuan Ligan sebagai Inhibitor.....	28
4.2.2 Perancangan Struktur Tiga Dimensi Ligan	31
4.2.3 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur Tiga Dimensi	32
4.3 <i>Molecular Docking</i>	32
4.4 Analisis <i>Docking</i>	34
4.4.1 Energi Bebas Ikatan ($\Delta G_{binding}$) dan Konstanta Inhibisi	37
4.4.2 Ikatan Hidrogen dan Kontak Residue	39
4.4.6 Analisis <i>Drug Scan</i>	44
4.11 Prediksi Sifat Toksisitas Inhibitor.....	47
5.KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR REFERENSI	52
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Inhibitor protein M2 <i>channel</i> yang telah dilaporkan	3
Gambar 2.1 Struktur Virus Influenza.....	5
Gambar 2.2 Mekanisme replikasi virus influenza	7
Gambar 2.3 Struktur Hemagglutinin	8
Gambar 2.4 Struktur Neuraminidase	9
Gambar 2.5 Struktur M2 <i>Channel</i>	11
Gambar 2.6 Struktur Amantadine.....	12
Gambar 2.7 Struktur Rimantadine.....	13
Gambar 2.8 Struktur (1R,2R,3R,5S)-(-) Isopinocampheylamine.....	14
Gambar 4.1 Struktur kristal 3 dimensi protein M2 <i>channel</i>	25
Gambar 4.2 Visualisasi Protein M2 <i>Channel</i> Influenza A (H1N1).....	26
Gambar 4.3 Struktur (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine.....	28
Gambar 4.4 Modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine	29
Gambar 4.5 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligan A20 dengan protein M2 <i>channel</i>	41
Gambar 4.6 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligan B18 dengan protein M2 <i>channel</i>	42
Gambar 4.7 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligan B20 dengan protein M2 <i>channel</i>	42
Gambar 4.8 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Amantadine dengan protein M2 <i>channel</i>	43
Gambar 4.9 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D rimantadine dengan protein M2 <i>channel</i>	43
Gambar 4.10 Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Isopinocampheylamine dengan protein M2 <i>channel</i>	44

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Struktur Gugus Fungsi.....	30
Tabel 4.2	Hasil <i>screening</i> 52 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 <i>channel</i>	34
Tabel 4.3	Hasil <i>screening</i> 20 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 <i>channel</i>	35
Tabel 4.4	Hasil <i>screening</i> 10 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 <i>channel</i>	36
Tabel 4.5	Hasil <i>screening</i> 5 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 <i>channel</i>	36
Tabel 4.6	Hasil <i>docking</i> 3 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 <i>channel</i>	37
Tabel 4.7	Data energi bebas ikatan hasil simulasi <i>docking</i>	38
Tabel 4.8	Residu asam amino protein M2 <i>channel</i> yang membentuk ikatan hidrogen dengan ligan.....	39
Tabel 4.9	Hasil <i>Drug scan</i> tiga ligan terbaik dan ligan standar	45
Tabel 4.10	Hasil <i>screening oral bioavailability</i> standar dan ligan (<i>Egan's Rules</i>).....	47
Tabel 4.11	Hasil ToxTree <i>Toxicity Prediction</i>	48
Tabel 4.12	Hasil Lazar <i>Toxicity Prediction</i>	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Bagan kerja penelitian.....	59
Lampiran 2	Parameter dan hasil pencarian sekuens protein <i>M2 channel</i>	60
Lampiran 3	<i>Multiple alignment</i> dengan ClustalW2.....	61
Lampiran 4	Hasil <i>multiple sequence alignment</i>	62
Lampiran 5	Format <i>Genpept</i> dan FASTA dari sekuen protein <i>M2 Channel</i> terpilih.....	71
Lampiran 6	Hasil pembuatan struktur 3D protein <i>M2 channel</i> dengan Hhpred ..	72
Lampiran 7	Data Struktur 3 Dimensi Protein <i>M2 Channel</i> dari PDB	73
Lampiran 8	Table rancangan ligan modifikasi (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine	74
Lampiran 9	Hasil Interaksi 10 Ligan Terbaik	79

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Virus influenza A merupakan virus patogen yang sangat menular dari burung dan mamalia, termasuk manusia (Webby *et al.*, 2001). Pandemi yang paling terkenal adalah flu Spanyol yang memberikan dampak besar penduduk dunia dan diperkirakan telah menewaskan sedikitnya 50 juta orang di tahun 1918-1919 (Betakova, 2007). Pada tahun 2009, flu babi kembali menyerang berbagai negara di dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menetapkan wabah virus influenza A H1N1 sebagai pandemi global pada 11 Juni 2009. Setidaknya ada sekitar 18.449 orang di seluruh dunia yang meninggal akibat serangan virus ini. Kemudian pada tanggal 10 Agustus 2010 Badan Kesehatan Dunia (WHO) secara resmi mengumumkan pandemi flu babi di dunia telah berakhir dan berganti menjadi fase *post pandemic*. Fase *post-pandemic* ini berarti aktivitas penyebaran flu tersebut diseluruh dunia sudah kembali ke level penanganan flu seperti yang biasa terjadi secara musiman. Fase *post pandemic* ini merupakan fase yang paling tepat untuk menemukan antiviral yang dapat mengatasi infeksi virus ini.

Flu babi atau *Swine Flu* teridentifikasi sebagai virus influenza strain baru yaitu virus influenza A H1N1. Virus influenza A H1N1 merupakan kombinasi dari gen virus influenza babi, avian dan manusia. Berdasarkan karakterisasi genetik, gen hemagglutinin (HA) mirip dengan virus swine influenza pada babi di Amerika, sedangkan gen neuraminidase (NA) dan Protein Matrix (M) mirip dengan virus flu babi yang diisolasi dari Eropa. Kombinasi genetik yang unik ini sebelumnya belum pernah dideteksi dimanapun, dan tidak ada pasien yang melakukan kontak langsung dengan babi yang dapat membawa kemungkinan terjadinya transmisi virus influenza strain baru ini antar manusia (<http://emedicinemedscape.com>).

Banyak obat atau antiviral dikembangkan untuk mengatasi infeksi ini, antara lain yaitu oseltamivir, zanamivir, amantadine dan rimantadine. Oseltamivir dan zanamivir merupakan inhibitor neuraminidase. Kedua obat antiviral tersebut

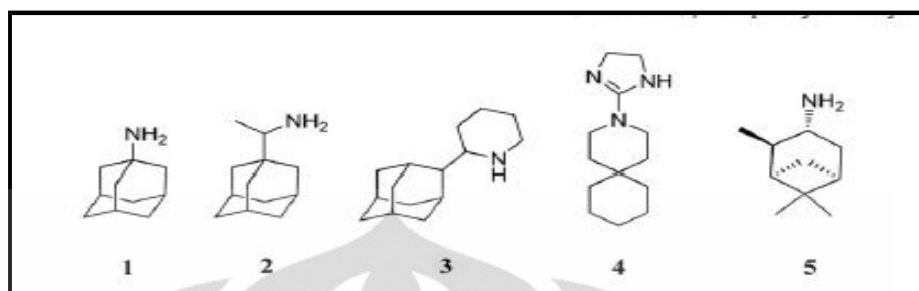
direkomendasikan oleh *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) dan WHO (Rungrotmongkol *et al.*, 2009), karena dinilai efektif dalam mengobati infeksi virus influenza yang terjadi pada manusia (Lew *et al.*, 2000). Akan tetapi akhir-akhir ini dilaporkan bahwa antiviral ini mengalami resistensi. Resistensi oseltamivir terhadap virus influenza tipe A (H1N1) dilaporkan di Eropa pada tahun 2007-2008 (Cheng *et al.*, 2009).

Selain itu terdapat pula amantadine, dan rimantadine, yang dapat digunakan untuk menghambat protein M2 *ion-channel* (de Clercq, 2006). Amantadine dan rimantadine telah disetujui oleh US Food and Drug Administration pada bulan Oktober 1966 sebagai agen profilaksis terhadap influenza Asia. Akan tetapi seiring dengan berjalannya waktu dimungkinkan virus resisten terhadap obat tersebut akibat terjadinya mutasi *antigenic drift* (Beigel *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2005). Tercatat bahwa tingkat resistensi Amantadine dan Rimantadine telah meningkat dari di bawah 10% selama 1995-2002, menjadi 58% pada tahun 2003, 74% di tahun 2004, dan 92% selama tahun 2005-2006.

Protein M2 *channel* pada virus influenza A adalah salah satu target dari obat anti-influenza yang selama ini sudah digunakan untuk mengontrol infeksi virus influenza, yaitu amantadine dan rimantadine. Akan tetapi akhir-akhir penggunaan obat amantadine dan rimantadine terbatas karena adanya resistensi terhadap obat-obatan tersebut. Resistensi tersebut disebabkan adanya mutasi dari strain virus influenza tersebut yaitu mutasi dari tiga residu pada virus influenza A H5N1, yakni pada posisi V28, S31 dan L43 bermutasi menjadi I28, N31 dan T43. Diantara ketiga mutasi residu tersebut, mutasi S31N adalah yang paling umum terjadi pada protein M2 *channel* yang dapat menyebabkan resistensi terhadap amantadine (Rungrotmongkol, *et. al.*, 2009).

Selain resistensi dari amantadine dan rimantadine belakangan dilaporkan pula bahwa amantadine juga memiliki efek samping terhadap sistem saraf pusat (Clercq *et al.*, 2006). Resistensi amantadine yang sangat merugikan sebagai obat antiviral terhadap kerja protein M2 *channel* memungkinkan dilakukannya pencarian terhadap inhibitor protein M2 *channel* yang dapat menggantikan senyawa turunan adamantine. Sampai saat ini telah dilaporkan beberapa inhibitor protein M2

channel yaitu 1. amantadine; 2. rimantadine; 3. turunan amantadine; 4. inhibitor non-admantane; 5. Isopinocampheylamine (Hu, 2010).



Gambar 1.1 Inhibitor protein M2 *channel* yang telah dilaporkan. Dari penelitian Wenhui Hu tahun 2010 tersebut dilaporkan bahwa senyawa nomor 5, yaitu senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine merupakan senyawa yang paling potensial sebagai inhibitor protein M2 *channel* dan tiga kali lebih aktif dibandingkan amantadine sebagai inhibitor M2 protein *channel* ($IC_{50}=1.363 \mu\text{M}$ vs $5.960 \mu\text{M}$). Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan modifikasi terhadap senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine untuk mencari inhibitor yang lebih potensial untuk menghambat protein M2 *channel* pada virus A H1N1.

1.2 Tujuan Penelitian

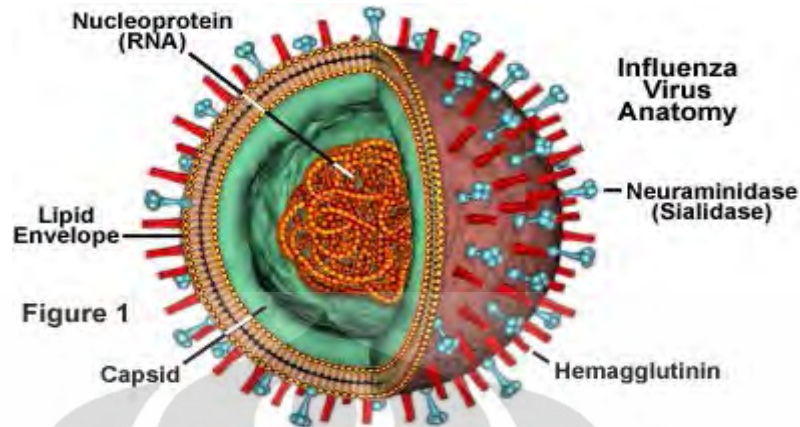
Tujuan dari penelitian ini adalah merancang obat (*drug design*) untuk virus influenza A H1N1 secara *in silico* berbasis senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine melalui metode *molecular docking*. Senyawa ini diharapkan dapat menggantikan antiviral amantadine dan rimantadine.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Influenza

Virus influenza merupakan virus yang termasuk dalam famili Orthomyxoviridae dan ordo Mononegavirales. Pada manusia virus ini dapat menyebabkan demam, pusing, batuk dan dalam beberapa kasus serius, menyebabkan pneumonia pada anak-anak dan orangtua hingga menyebabkan kematian. (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006). Virus influenza memiliki genom RNA berupa rangkaian tunggal berpolaritas negatif sebanyak 7-8 segmen yaitu *Polymerase Basic subunit 1* (PB1), *Polymerase Basic subunit 2* (PB2), *Polymerase Acidic* (PA), *Nucleoprotein* (NP), *Neuraminidase* (NA), *Hemagglutinin* (HA), protein *Matrix subunit 1* (M1), protein *Matrix subunit 2* (M2), protein *nonstructural subunit 1* (NS1) dan protein *nonstructural subunit 2* (NS2). Virus influenza ini dibagi menjadi 3 tipe berdasarkan perbedaan sifat antigen internal dari *nucleocapsid protein* (NP) dan matriks protein (MP), yaitu tipe A, B, dan C. Virus influenza A dan B terdiri dari 8 segmen, sedangkan virus influenza C terdiri dari 7 segmen. Virus influenza A dapat menginfeksi unggas maupun mamalia (termasuk manusia) dan bersifat patogen terhadap hospesnya sedangkan virus influenza B dan C dapat diisolasi dari mamalia dan umumnya kurang patogen dibandingkan dengan virus influenza tipe A. (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006). Virus influenza lebih lanjut dibagi menjadi beberapa subtipe berdasarkan antigen eksternal permukaan glikoprotein yang tersusun dari Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA). Virus influenza A memiliki 16 jenis Haemagglutinin dan 9 jenis Neuraminidase (Maasab et. al., 1999). **Gambar 2.1**



Gambar 2.1 Struktur Virus Influenza

Sumber: <http://sciencebiotech.net/mengenal-virus-influenza/> diakses Januari 2011

2.2 Virus Influenza H1N1 (*Swine Flu*)

Virus Influenza H1N1 merupakan virus influenza yang termasuk dalam virus influenza tipe A. Penyakit yang disebabkan oleh virus H1N1 ini dikenal sebagai flu babi atau *swine flu*. Pada virus H1N1 yang diisolasi dari pasien di Amerika, ditemukan bahwa virus H1N1 tersebut tersusun dari unsur-unsur genetik yang berasal dari empat virus flu yang berbeda, yaitu campuran dari virus H1N1 Amerika Utara, H5N1 Amerika Utara, flu manusia, dan H1N1 yang biasanya ditemukan di Asia dan Eropa. Virus yang baru ini nampaknya merupakan hasil *reassortment* dari virus flu manusia dan flu babi, dalam keempat strain yang berbeda dari subtipe H1N1 (Rungrotmongkol, *et al.*, 2009).

Karakterisasi genetik awal mengungkap bahwa gen hemagglutinin (H) mirip dengan gen H pada virus flu babi yang ada di USA sejak tahun 1999, sedangkan gen neuraminidase (N) dan gen protein matriks (M) merupakan versi *resemble* yang ada pada isolat flu babi Eropa. Enam gen dari flu babi Amerika sendiri merupakan campuran virus flu babi, flu burung, dan flu manusia. Hasil studi kristalografi menjelaskan bahwa virus dapat menginfeksi dan menyebar antar manusia karena adanya perubahan struktur pada H1 dari protein hemagglutinin yang membuat virus dapat mengenali reseptor manusia (Gamblin *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2004)

Virus H1N1 dapat bertahan hidup di air sampai empat hari pada suhu 22°C dan lebih dari 30 hari pada suhu 0°C. Virus akan mati pada pemanasan 60°C selama 30 menit atau 56°C selama 3 jam atau dengan detergen, desinfektan

misalnya formalin, serta cairan yang mengandung iodine. Masa inkubasi virus influenza bervariasi antara 1-7 hari (<http://www.litbang.depkes.go.id/>).

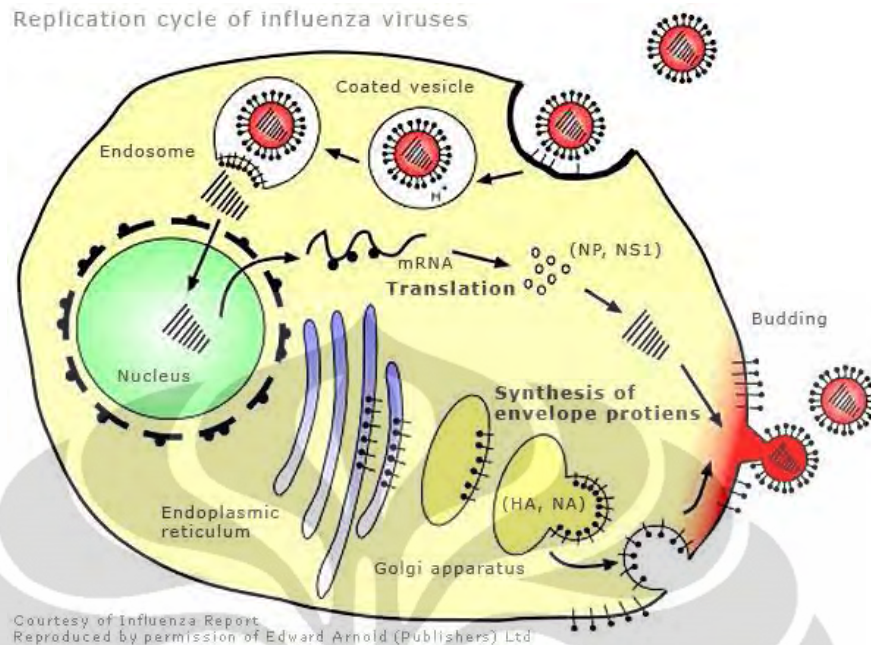
2.3 Infeksi Virus Influenza A

Siklus hidup virus influenza A dimulai dari proses infeksi virus avian influenza. Tahap pertama proses infeksi virus adalah proses pengikatan Hemagglutinin dengan *sialic acid* dari sel permukaan host. Langkah selanjutnya, virus akan masuk melalui proses fusi antara amplop virus dengan membran endosomal sel host. Langkah ini dilakukan dengan proses endositosis melalui mediasi penurunan pH pada phagosom. Penurunan pH akan dihentikan oleh kerja protein M2 setelah komponen virus telah masuk ke dalam sel host. Selanjutnya akan terjadi serangkaian penataan ulang protein matrix-1 (M1) dan kompleks glikoprotein homotrimetrik Hemagglutinin sehingga menghasilkan sebuah domain yang lipofilik dan fusogenik dari setiap monomer Hemagglutinin (HA0) menjadi fragmen 1 (HA1) dan fragmen 2 (HA2) yang akan memungkinkan virus melepaskan ribonukleoproteinnya (RNP) (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

Langkah berikutnya adalah transport RNP ke nukleus dan kompleks polimerase terikat pada viral RNA. Pada tahap ini terjadi pemutusan viral RNA oleh aktivitas endonuklease dan secara simultan terjadilah proses perpanjangan. Pembentukan dari viral RNA akan dibatasi oleh NP yang akan membentuk mRNA. Viral RNA (vRNA) dikopi dari (-) sense menjadi (+) cRNA dan mRNA. cRNA akan tetap berada di inti yang berfungsi sebagai *template* pada prodeuk (-) sense vRNA baru, sedangkan mRNA akan berpindah ke sitoplasma untuk memproduksi protein (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

Langkah berikutnya viral protein yang baru terbentuk kembali lagi ke inti sel untuk membentuk vRNA lagi dan membentuk RNP atau viral protein yang baru terbentuk dikeluarkan menuju badan golgi dan terjadi proses glikosilasi. Protein yang dibentuk ini kemudian dibawa ke membran sel dimana mereka akan terikat dengan lipid bilayer (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

Tahap terakhir adalah vRNA dan inti viral meninggalkan inti sel menuju membran dan melakukan pemisahan dengan sel host melalui aktivitas NA, proses ini dikenal dengan sebutan *budding* (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).



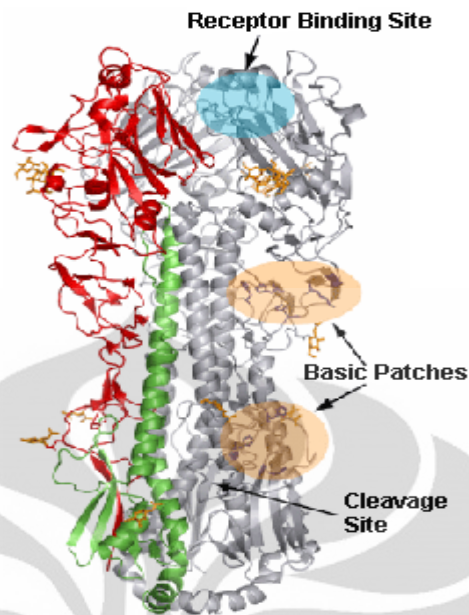
Gambar 2.2 Mekanisme replikasi virus influenza

Sumber : <http://www.ifpma.org/index.php?id=4175> diakses Januari 2011

2.4 Hemagglutinin (HA)

Hemagglutinin (HA), merupakan glikoprotein yang memiliki dua atau tiga *glycosylation site* dengan berat molekul sekitar 76.000 yang terdapat pada membran dan merupakan bagian utama yang memiliki lima antigen yang dominan yang terdapat di permukaan sel. Hemagglutinin ini merupakan homotrimer dan masing-masing merupakan polipeptida tunggal yang terpisah menjadi H1 dan H2 (**Gambar 2.3**).

Hemagglutinin memiliki dua fungsi utama, yaitu untuk mengenali sel target pada vertebrata yang akan berikatan dengan virus dan membantu masuknya genom viral ke dalam sel melalui penggabungan membran endosom pada *host* dengan membran viral. Hemagglutinin inilah yang nantinya akan berikatan dengan *sialic acid* yang merupakan antigen yang utama pada virus. Sejauh ini telah diketahui ada 16 jenis antigen hemagglutinin. Subtipe ini diberi nama H1 sampai H16. H16 hanya baru ditemukan pada virus influenza A yang diisolasi dari burung gagak berkepala hitam yang ada di Swedia dan Norwegia.



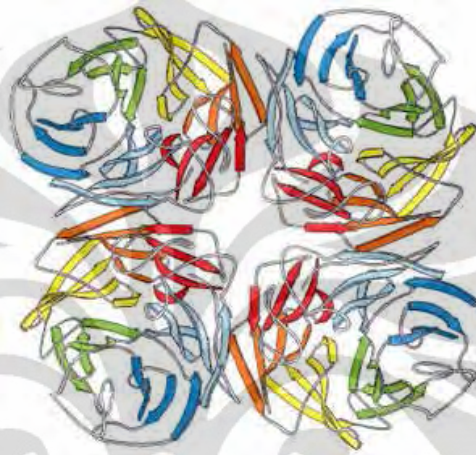
Gambar 2.3 Struktur Hemagglutinin

Sumber: www.FluTrackers.com diakses Januari 2011

Sampai saat ini hanya H1, H2, dan H3 yang mampu menyebar antar manusia dan menjadi pandemik. Pelekatan ke protein permukaan sel dari virion-virion virus influenza A tercapai melalui tertrimerisasi glikoprotein H virus yang matang (*mature trimerised viral H glycoprotein*). Stratifikasi pelekatan tersebut didasarkan pada pengenalan spesies *sialic acid* (N-asetil- atau N-asam glikolineuraminat) ujung akhir yang jelas, tipe hubungan glikosidik ke galaktosa paling ujung (α 2-3 atau α 2-6) dan susunan fragmen yang terletak lebih dalam dari sialil-oligosakarida yang terdapat di permukaan sel (Herrier *et al.*, 1995; Gambaryan *et al.*, 2005). Perubahan pengenalan dari *sialic acid* pada glukosanya dari α 2-3 menjadi α 2-6 merupakan penyebab utama dari virus influenza A untuk menginfeksi spesies baru dan mengubah *host* (Stevens *et al.*, 2006). Pada hemagglutinin untuk subtipe H3, dan H2 terdapat dua buah posisi yang menentukan kemampuan pengenalan reseptor, yaitu residu asam amino pada posisi 226 dan 228. Pada virus yang hanya mengenali SA α 2-3 Gal posisi 226 merupakan glutamina (Gln) sedangkan untuk virus yang mampu mengenali SA α 2-6 Gal merupakan leusina (Leu). Sementara pada posisi 228 pengenal SA α 2-3 Gal adalah glisina (Gly) dan pengenal SA α 2-6 merupakan serina (Ser) (Gamblin *et al.*, 2004).

2.5 Neuraminidase (NA)

Neuraminidase merupakan glikoprotein yang juga ditemukan pada permukaan virus. Neuraminidase memiliki struktur tetramer dan bobot molekul rerata 220.000 (**Gambar 2.4**). Molekul N menampilkan bagian utamanya pada permukaan luar dari sel, menempel pada lipid bilayer, dan memiliki ekor sitoplasma yang kecil (Gurtler *et al.*, 2007).



Gambar 2.4 Struktur Neuraminidase

Sumber: <http://www.scientificpsychic.com/health/virus.html> diakses Januari 2011

Neuraminidase berfungsi sebagai enzim yang memisahkan antara molekul H dengan *sialic acid* dari molekul N yang lain, dan dari glikoprotein dan glikolipid pada permukaan sel. Neuraminidase juga merupakan antigen yang berperan penting pada saat penetrasi virus memasuki lapisan mucin pada epitelium.

Neuraminidase merupakan molekul target dari senyawa inhibitor neuraminidase yang akan memotong reseptor selular residu *sialic acid*. Pemotongan ini melepaskan virus-virus, yang nantinya akan menyerang sel-sel baru. Tanpa neuraminidase, infeksi akan dibatasi pada satu putaran replikasi, yang cukup jarang menyebabkan penyakit. Neuraminidase juga dapat memfasilitasi invasi viral bagian atas, kemungkinan dengan memotong *sialic acid* menjadi setengahnya pada mucin yang mengelilingi sel epitel bagian atas. Kemampuan pada keadaan transisi analog dengan *sialic acid* dalam menghambat neuraminidase virus influenza yang pertama kali dikenal pada tahun 1970, namun desain inhibitor yang efektif dapat dilakukan dengan analisis struktur tiga dimensi

neuraminidase virus influenza terbuka baik lokasinya maupun struktur sisi katalitiknya (Moscona, 2005).

Inhibitor neuraminidase mirip dengan substrat alami neuraminidase dan inhibitor ini akan berikatan dengan sisi aktif untuk menghalangi enzim yang akan memotong reseptor sel inang. Dengan demikian, hal ini dapat mencegah infeksi sel-sel inang yang baru dan menghentikan penyebaran infeksi. Dua inhibitor neuraminidase yang berlisensi yaitu zanamivir (Relenza) dan oseltamivir (Tamiflu), memiliki toksisitas yang rendah dan efektif melawan semua subtype neuraminidase. Selain itu obat tersebut mampu melawan semua *strain* virus influenza.

2.6 Polymerase A Protein (PA), Polymerase B1 Protein (PB1), dan Polymerase B2 Protein (PB2)

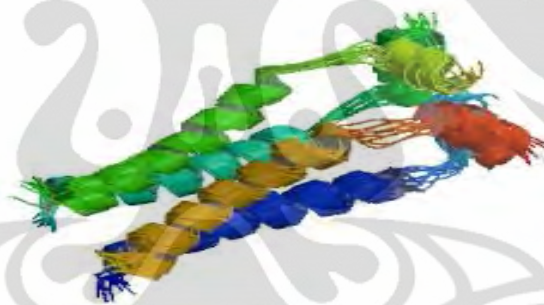
Virus influenza A terdiri atas delapan galur negatif DNA yang dikode oleh sebelas protein. Polymerase influenza merupakan sebuah heterotrimerik ~250 kD terdiri atas tiga protein kompleks, yaitu PA, PB1, dan PB2. Protein PA, PB1, dan PB2 merupakan RNA polimerase aktif yang mampu melakukan replikasi dan transkripsi. Fungsi dari protein ini adalah sebagai enzim yang akan menggandakan rantai RNA pada virus pada saat terjadi replikasi di dalam sel inang (vRNA→cRNA→vRNA) (Liu *et al.*, 2009). PB1 merupakan central protein, yang akan berinteraksi dengan PA dan PB2 dengan domain yang berbeda (PA-PB1-PB2) (Jung *et al.*, 2006). PB1 berperan di dalam proses transkripsi dan replikasi viral RNA sebagai classic polymerase, yang bertanggung jawab untuk polimerisasi dan pemotongan endonuklease (Lamb & Krug, 2001; Fodor, et al., 2002; Jung, et al., 2006). PB2 mempunyai aktifitas sebagai cap-binding (Lamb & Krug, 2001; Fodor, et al., 2002; Fechter, et al., 2003; Neumann, et al., 2004). Sedangkan PA terlibat didalam replikasi, elongasi dan aktivitas endonuklease (Fodor *et al.*, 2002; Huarte *et al.*, 2004; Kawaguchi *et al.*, 2005).

2.7 Protein M2 Channel

Protein M2 *channel* virus influenza yang bekerja sebagai protein saluran ion. Saluran itu sendiri adalah sebuah homotetramer (terdiri dari empat unit M2 identik), pada bagian unit yang heliks distabilkan oleh dua ikatan disulfide

Gambar 2.5. Protein M2 *channel* diaktifkan oleh pH rendah. Pada tahap pembentukan endosom di mana virus influenza flu mulai memasuki sel, protein M2 *channel* memungkinkan proton (H^+) dari lingkungan asam endosom masuk ke dalam badan virus yang menyebabkan terurainya virus itu sehingga materi genetik RNA virus influenza dapat lepas ke dalam sel yang diinfeksi. Dengan menghambat kerja protein M2 *channel*, amantadine dan rimantadine menghalangi keluarnya RNA virus ke dalam sel.

Protein M2 *channel* memiliki peran penting dalam siklus hidup virus influenza. Terletak di *envelope* virus. Hal ini memungkinkan ion hidrogen untuk masuk ke dalam partikel virus (virion) dari endosom sehingga menurunkan pH dalam virus, yang menyebabkan disosiasi protein matriks M1 dari RNP *ribonucleoprotein*. Ini merupakan langkah penting dalam *uncoating* virus dan mengeluarkan isinya ke dalam sitoplasma sel inang.



Gambar 2.5 Struktur M2 *Channel*
Sumber : RSCB Protein Data Bank

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=2KIH>) diakses Januari 2011

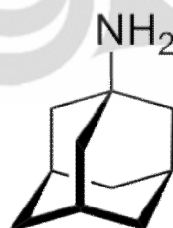
Fungsi dari saluran M2 dapat dihambat oleh obat antivirus amantadine dan rimantadine, yang kemudian menghambat virus dan mengambil alih sel inang. Molekul obat yang terikat dalam wilayah transmembran, secara sterik memblokir saluran. Hal ini menghentikan proton memasuki virion, yang kemudian tidak hancur. Namun, gen M2 rentan terhadap mutasi. Ketika terjadi penggantian (mutasi) salah satu dari lima asam amino di daerah transmembran, virus akan mengalami resistansi terhadap inhibitor M2 yang ada. Pada penelitian ini protein M2 *channel* merupakan protein target dalam proses docking dengan kandidat ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine-based drugs.

2.8 Protein NS1 dan NS2

Protein NS1 merupakan mRNA yang memiliki bobot molekul 26000. Protein ini akan membantu transport viral RNA ke ribosom untuk ditranslasikan. Sedangkan NS2 merupakan molekul yang lebih kecil dengan bobot molekul 11000. Protein ini dipercaya memiliki fungsi memfasilitasi transpor RNP yang baru disintesis dari inti sel menuju sitoplasma, untuk mempercepat penggandaan virus.

2.9 Amantadine

Amantadine adalah senyawa organik yang dikenal secara resmi sebagai 1-adamantylamine atau 1-aminoadamantane. Molekul terdiri dari kerangka Adamantane yang diganti pada salah satu dari empat metin dengan kelompok amino. Senyawa ini dijual dengan nama Symmetrel untuk digunakan baik sebagai antivirus dan obat antiparkinsonian. Terlepas dari keperluan medis, senyawa ini berguna sebagai sebuah blok bangunan, memungkinkan penyisipan sebuah kelompok adamantil. Amantadine telah disetujui oleh US Food and Drug Administration pada bulan Oktober 1966 sebagai agen profilaksis terhadap influenza Asia dan akhirnya memperoleh persetujuan untuk pengobatan virus Influenza A pada orang dewasa. Menurut US Centers for Disease Control and Prevention, 100% dari musiman H3N2 dan sampel pandemic flu tahun 2009 yang diuji telah menunjukkan perlawanan terhadap adamantane, dan amantadine tidak lagi dianjurkan untuk pengobatan influenza.



Gambar 2.6. Struktur Amantadine

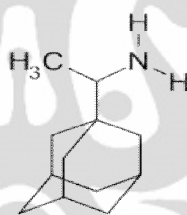
Sumber: <http://en.wikipedia.org/wiki/Amantadine> diakses Maret 2011

2.10 Rimantadine

Rimantadine (dijual dengan nama dagang Flumadine) adalah obat antivirus oral yang digunakan untuk mengobati infeksi virus Influenza A. Ketika

diambil dalam waktu satu sampai dua hari gejala berkembang, rimantadine dapat mempersingkat durasi dan moderat tingkat keparahan influenza. Baik rimantadine dan obat sejenis amantadine adalah turunan dari adamantane. Rimantadine telah disetujui oleh Administrasi Makanan dan Obat (FDA) pada tahun 1994.

Menurut CDC, 100% dari H3N2 musiman dan 2009 flu pandemi sampel yang diuji telah menunjukkan perlawanan terhadap rimantadine dan tidak lagi dianjurkan untuk memberikan resep untuk pengobatan flu. Rimantadine diyakini menghambat replikasi virus influenza dengan mencegah uncoating materi pelindung dari virus tersebut, yang merupakan amplop dan kapsid. Penelitian genetik menunjukkan bahwa protein M2 virus yang berupa saluran ion ditentukan oleh gen virion M2, memainkan peran penting dalam kerentanan virus influenza A untuk diinhibisi oleh rimantadine. Resistensi terhadap rimantadine dapat terjadi sebagai akibat dari substitusi asam amino pada lokasi tertentu di wilayah transmembran M2. Hal ini mencegah pengikatan antivirus ke saluran tersebut.



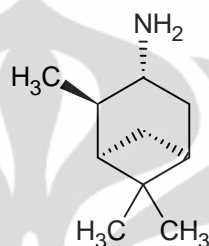
Gambar 2.7. Struktur Rimantadine

Sumber: <http://en.wikipedia.org/wiki/Amantadine> diakses Maret 2011

2.11 (1R,2R,3R,5S)-(-)-Isopinocampheylamine

Senyawa Isopinocampheylamine merupakan salah satu senyawa amina primer yang memiliki nama IUPAC (1R,2R,3R,5S)-(-)-2,6,6-trimethyl bicyclo [3.1.1] heptan-3-amine. Senyawa ini juga dikenal dengan nama lain 1S,2S,3S,5R)-3-Pinanamine; (+)-Isopinocampheylamine, (1S,2S,3S,5R)-3-Pinanamine. Senyawa ini memiliki berat molekul sebesar 153,26 gr/mol dengan rumus molekul $C_{10}H_{19}N$. Senyawa ini memiliki massa jenis sebesar 0.909 g/mL pada suhu 25 °C. Menurut penelitian Zeng tahun 2010 senyawa isopinocampheylamine ini dapat digunakan sebagai inhibitor protein M2 *channel* virus influenza A menggantikan antiviral yang sudah ada yaitu amantadine dan rimantadine yang terbukti sudah tidak dianjurkan lagi penggunaannya oleh WHO.

Gugus amina primer pada senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dapat memiliki peran yang sama dengan gugus amino pada senyawa amantadine yaitu sebagai penghalang dari aliran proton pada virus influenza A. Cincin bisiklik dari senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine juga memiliki peran yang sama dengan gugus adamantil pada senyawa amantadine yaitu sebagai kerangka yang memberikan efek sterik.



Gambar 2.8 Struktur (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine

2.12 Drug Design

Drug design adalah suatu metode perancangan obat yang berdasarkan pada analisis biologis dan fisik dari targetnya. Targetnya merupakan molekul-molekul atau bagian dari makromolekulnya yang berperan vital di dalam proses metabolik dari kondisi patologis seseorang akibat penyakit yang disebabkan oleh mikroba pathogen. Umumnya obat ini dirancang untuk menghambat atau menghentikan makromolekul tersebut dengan cara membentuk ikatan terhadap sisi aktif dari molekul-molekul tersebut sehingga molekul obat berperan sebagai inhibitor. Hal yang harus dipertimbangan di dalam merancang inhibitor sebagai obat, antara lain adalah spesifitas dan potensi inhibisinya.

Perancangan obat dapat dilakukan secara komputasi (*in silico*). Sebelum teknologi informasi berkembang pesat, metode yang digunakan untuk menemukan inhibitor yang tepat adalah dengan melakukan *screening* dari berbagai komponen, setelah itu dilakukan pengujian kepada enzim target secara *trial-and-error*. Tetapi kini, dengan mengetahui sisi aktif dan struktur tiga dimensi dari enzim target, secara *in silico* dapat diprediksi molekul yang dapat berperan sebagai inhibitor sehingga proses *screening* dan pengujian secara eksperimental menjadi lebih rasional dan efisien.

2.13 Bioinformatika

2.13.1 Definisi

Bioinformatika adalah metode matematika, statistik, dan komputasi yang merupakan pengkombinasi dengan menggunakan sekuen DNA dan asam amino dan informasi-informasi yang terkait dengannya. Bioinformatika merupakan pengkombinasian berbagai disiplin ilmu termasuk ilmun komputer, matematika, fisika, biologi dan ilmu kedokteran yang saling menunjang dan bermanfaat satu sama lain (Utama, 2003). Bioinformatika berfungsi untuk menganalisis posisi sejauh mana perbedaan suatu virus dengan virus lainnya.

Bioinformatika, khususnya pada bidang biologi molekuler, membuka sudut pandang baru dalam menyelesaikan persoalan biologi molekuler (Baxevanis dan Oullete, 2001).

2.13.2 *Protein Data Bank (PDB)*

PDB merupakan data yang berisi koleksi struktur 3 dimensi protein, DNA dan molekul kompleks lainnya yang telah dipublikasikan dan ditentukan secara eksperimen dengan menggunakan kristalografi X-ray atau spektroskopi NMR. Pada kristalografi X-ray, sinar X dipancarkan kepada kristal yang mengandung jutaan salinan suatu molekul. Sinar-X kemudian akan didifraksikan oleh kristal dan membentuk suatu pola yang bila dianalisis secara matematis akan menunjukkan posisi tiap atom di dalam molekul. Spektroskopi NMR menggunakan molekul di dalam larutan dan akan memperlihatkan orientasi atom di dalam medan magnetik (Baxevanis & Outlette, 2001).

Database struktural menyimpan data mengenai struktur protein. Sumber primer untuk data struktur protein adalah PDB yang tersedia pada *URL* <http://www.pdb.org/>. ini adalah arsip data struktural tunggal tingkat dunia yang dibuat oleh Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RSCB), di Universitas New Jersey di Rutgers.

2.13.3 *Format GenBank Flatfile*

Format penyimpanan data yang paling umum digunakan adalah format *GenBank Flatfile Format* (GBFF), yang merupakan format elementer penyimpanan informasi dalam *GenBank*. *GenBank* merupakan suatu institusi yang

menyimpan dan mengelola database urutan DNA suatu gen dan ekspresi asam aminonya. Urutan DNA diperoleh dari berbagai penelitian, yang dengan sukarela mempublikasikan hasil penelitiannya untuk masyarakat umum. *GenBank* didirikan oleh National Center for Biotechnology Information (NCBI) bersama dengan Data Bank of Japan and European Bioinformatics Institute (EBI) (Baxevanis & Outlette, 2001).

2.13.4 Format FASTA

Format FASTA terdiri atas definition line dan sequence asam amino atau nukleotida. Format ini merupakan format input untuk berbagai program analisis bioinformatika. Format FASTA tergolong kurang informatif dibandingkan dengan format lainnya, namun format ini lebih praktis jika dipakai untuk data-data primer pada manusia. Dalam format FASTA penamaan protein pada sequence menggunakan kode satu huruf (*1-letter code*). Penamaan protein memiliki dua jenis pengkodean, yaitu *1-letter code* dan *3-letter code*. Sebagai contoh untuk triptofan digunakan W sebagai *1-letter code* dan Trp sebagai *3-letter code*. Semua format di dalam bioinformatika, termasuk format FASTA menggunakan *1-letter code*.

2.13.5 Multiple Sequence Alignment

Multiple sequence alignment merupakan metode pensejajaran dua atau lebih sekuens DNA atau asam amino menggunakan algoritma tertentu dengan bantuan komputer, sehingga didapatkan area yang memiliki urutan relatif identik satu sama lain. Metode *alignment* berfungsi untuk mencari daerah yang dipertahankan (*conserved region*), dan homologi antar sekuens nukleotida atau protein didasarkan atas prinsip kesamaan struktural, fungsional, dan sekuen (Claverie dan Notredame, 2003).

Berdasarkan pada jumlah sekuen yang digunakan, *sequence alignment* dibagi menjadi dua jenis, yaitu *pairwise alignment* jika melibatkan dua sekuen dan *multiple sequence alignment* jika melibatkan lebih dari dua sekuen.

2.13.6 *Comparative Modeling (Homology Modeling)*

Comparative modeling atau disebut juga *homology modeling* adalah prediksi struktur protein target dengan cara membandingkan dengan struktur protein yang homolog. Metode ini mengandalkan pada kekuatan kode pelipatan (folding). Oleh karena itu, perubahan kecil pada sequence asam amino protein pada umumnya menghasilkan perubahan minimal pada struktur tersier protein (Krane dan Raymer, 2003).

Kualitas *homology modeling* bergantung pada kualitas dari urutan keselarasan dan struktur *template*. Pendekatan dapat menjadi rumit oleh kehadiran keselarasan kesenjangan (indels), yang menunjukkan wilayah struktural yang ada pada target tetapi tidak pada *template*, dan struktur kesenjangan pada *template* yang muncul dari resolusi miskin dalam prosedur eksperimental (biasanya X-ray kristalografi) digunakan untuk memecahkan struktur. Kualitas urutan model menurun dengan menurunnya identitas (Wulandari, 2010).

2.13.7 *Molecular Modelling*

Molecular modeling merupakan suatu metode untuk merancang dan menganalisis struktur dan sifat-sifat molekul tertentu dengan menggunakan teknik kimia komputasional dan teknik visualisasi grafis yang bertujuan untuk menyediakan struktur geometri tiga dimensi yang sesuai dengan parameter kondisi yang telah ditentukan. *Molecular modelling* merupakan gabungan dari data empiris dengan teknik komputasional untuk menirukan dan memodelkan perilaku molekul sehingga dapat digunakan untuk mempelajari sistem molekuler tertentu (Leach, 2001). Salah satu kunci utama dari *molecular modelling* adalah penghitungan energi konformasi dan interaksi. Energi ini dapat dihitung dengan berbagai metode mulai dari penghitungan mekanika kuantum hingga fungsi empiris energi (Teodoro *et al.*, 2001).

Salah satu aplikasi dari *molecular modelling* adalah *molecular docking*, yang dalam kaitannya dengan *docking*, evaluasi energi dapat diselesaikan dengan bantuan fungsi *scoring*. Berbagai fungsi *scoring* yang umum biasanya berdasarkan pada *forcefield* yang dirancang untuk mensimulasikan fungsi dari protein. *Forcefield* merupakan fungsi empiris energi potensial permukaan dari

suatu protein. *Forcefield* ini didapatkan dengan mengembangkan model melalui kombinasi antara bentuk ikatan (jarak ikatan, sudut ikatan, sudut torsi) dan bentuk tanpa ikatan (van der waals dan elektrostatik) (Teodoro *et al.*, 2001).

2.13.8 *Molecular Docking*

Molecular docking merupakan suatu proses komputasi dalam mencari sebuah ligan yang dapat terikat baik secara geometris dan energisitas terhadap *binding site* dari sebuah protein (Teodoro *et al.*, 2001). *Molecular docking* bertujuan untuk memprediksikan struktur dari kompleks intermolekul yang terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul.

Saat ini *molecular docking* banyak diaplikasikan di dalam drug design untuk memprediksikan orientasi ikatan antara kandidat molekul obat dengan protein target sehingga dapat diketahui afinitas dari molekul obat tersebut. Selama ini simulasi *docking* hanya melibatkan satu ligan selama proses *docking*. Namun, dalam kenyataannya dalam proses pengenalan molekuler selalu melibatkan lebih dari satu spesies molekuler. Terdapat dua aspek penting di dalam *molecular docking*, yaitu *posing* dan *scoring*. *Posing* merupakan proses di dalam menentukan konformasi dan orientasi ligan dapat tepat berikatan dengan sisi aktif enzim. Proses ini merupakan prosedur yang dapat memberikan beberapa alternatif hasil. Sedangkan *scoring* merupakan nilai dari posisi yang terukur pada saat ligan tepat berikatan dengan sisi aktif enzim. Proses *scoring* selama fase posisi biasanya melibatkan perhitungan energi. Selain itu terdapat proses *re-scoring* selanjutnya dapat digunakan untuk mengestimasi secara lebih akurat energi bebas ikatan.

2.14 Prediksi Sifat Farmakologi Secara *In Silico*

Banyak Penelitian kemoinformatika memusatkan perhatian pada analisis dan prediksi senyawa yang berpotensi dalam hal karakteristik ADME-Tox (Leach,2001; Wulandari, Evi Kristin. 2010). Sebelum suatu senyawa disintesis atau diuji sebagai obat, perlu dikalkulasi nilai *drug-likeness* berdasarkan struktur molekuler. *Drug-likeness* mengacu pada kemiripan suatu senyawa dengan obat oral (Wulandari, Evi Kristin.2010). Metode untuk mengevaluasi *drug-likeness* adalah dengan menggunakan aturan Lipinski's Rule of Five yang dikembangkan oleh Christopher A.Lipinski pada tahun 1997, berdasarkan pengamatannya pada

sebagian besar obat yang ukurannya relatif kecil dan lipofilik (Wulandari, Evi Kristin.2010). Aturan tersebut menetapkan bahwa molekul harus mempunyai massa molekul relatif kurang dari 500 g/mol, nilai koefisien partisi (logP-suatu ukuran hidrofobisitas) kurang dari 5, dan akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10 (Wulandari, Evi Kristin.2010).

Nilai logP berkaitan dengan lipofilisitas atau hidrofobisitas yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid, dan pelarut non polar. Dalam konteks farmakokinetika (apa yang tubuh lakukan untuk suatu obat), untuk obat yang diabsorpsi melalui oral, secara normal harus melewati lipid bilayer dalam epithelium intestinal (prosesnya disebut transport selular). Supaya sistem transport efisien, obat harus cukup hidrofobik untuk menembus ke dalam lipid bilayer, tapi jangan terlalu hidrofobik, karena sekali masuk ke dalam bilayer, tidak dapat menembus keluar lagi yang menyebabkan obat tersebut lebih toksik karena bertahan lebih lama di dalam tubuh. Demikian juga, hidrofobisitas memainkan peranan utama dalam menentukan kemana obat akan didistribusikan di dalam tubuh setelah adsorpsi dan konsekuensinya dalam seberapa cepat obat mengalami metabolisme dan diekskresikan (Evi Kristin, 2010).

Bioavailibilitas oral yang tinggi seringkali menjadi pertimbangan yang penting untuk mengembangkan molekul bioaktif sebagai zat terapi (Veber, et al, 2002; Evi Kristin, 2010). Bioavailibilitas oral adalah sejauh mana suatu obat atau bahan lainnya akan tersedia untuk jaringan target setelah pemberian obat atau bahan tersebut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Veber, et.al (*Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailibility of Drug Candidate*), disimpulkan bahwa semakin rendah Mr, jumlah *rotatable bond*, ikatan hidrogen (*H-donor dan H-acceptor*), dan luas (daerah) permukaan polar maka akan semakin tinggi bioavailibilitas suatu kandidat obat.

Peningkatan laju permeasi/peresapan juga sebanding dengan penurunan daerah permukaan polar, jumlah ikatan hidrogen, dan *rotatable bond*. Kontributor utama daerah permukaan polar adalah donor atau akseptor ikatan hidrogen. Semakin besar jumlah donor atau akseptor ikatan hidrogen semakin luas pula daerah permukaan polar (Evi Kristin, 2010).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat PC komputer *Intel dual Core*, yang ditunjang dengan akses internet untuk menjalin koneksi dengan program yang *online*. Selain itu untuk mencetak hasil penelitian yang dihasilkan digunakan printer Canon Pixma IP 1980.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah berupa *software* bioinformatika. *Software* tersebut antara lain, *ACDLabs*, *Vegazz*, *MVM (Molecular Visualisation and Modelling)*, dan *MOE 2008.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada)*. Program *online* yang digunakan *ClustalW2 (EBI)*, *Swiss-Model Workspace (Swiss Institute of Bioinformatics & the Biozentrum University of Basel)* dan *PAPProc versi 1.0*.

3.2. Lingkup Kerja

3.2.1. Preparasi Protein M2 *channel*

3.2.1.1 Pencarian Sekuen Protein M2 *channel* Virus H1N1

Pencarian data sekuen protein Matrik 2 (M2) virus H1N1 pada inang manusia dan babi dilakukan melalui server *GenBank Influenza Virus (IVR-NCBI)*. Homepage server *IVR-NCBI* dapat diakses pada alamat situs : <http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database.html>. Format sekuen yang dipakai untuk menyimpan sekuen protein M2 adalah format *FASTA* karena format tersebut paling banyak digunakan untuk analisis pada *software-software* selanjutnya dibandingkan format *GBFF*. Sekuen protein terdiri dari urutan huruf-huruf, setiap huruf merupakan kode dari suatu asam amino.

3.2.1.2 *Multiple Sequence Alignment*

Sekuen protein M2 virus H1N1 inang manusia dan babi dalam format *FASTA* dimasukkan sebagai input ke dalam server *ClustalW2* yang tampilan homepage server tersebut dapat diakses secara on line pada situs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>. Melalui server tersebut dilakukan penyejajaran terhadap setiap protein M2 virus H1N1. Kemudian ditentukan

perwakilan sekuen protein M2 berdasarkan nilai tertinggi untuk digunakan sebagai input analisis selanjutnya.

3.2.1.3. Pencarian Struktur Tiga Dimensi Protein M2 Channel

Pencarian struktur tiga dimensi dari sekuen dilakukan dengan menggunakan *software Hhpred* dari *Max Planck Institute* yang dapat diakses melalui website <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>. Struktur tiga dimensi yang dipilih adalah yang mempunyai kesamaan paling tinggi terhadap *Receptor Binding Protein* sekuen M2 channel.

3.2.1.4. Pencarian Data PDB Struktur Tiga Dimensi Protein M2-channel

Struktur tiga dimensi M2 channel dapat diunduh dari database PDB yang ada di *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* melalui alamat situs <http://www.rcsb.org/pdb/> dengan menggunakan perangkat komputer yang terhubung dengan koneksi internet.

3.2.1.5. Optimasi Geometri dan Minimasi Energi Protein M2-channel

Optimasi geometri dan minimasi energi struktur tiga dimensi M2 channel dilakukan dengan menggunakan *software MOE* yang dijalankan pada *single computer Intel Pentium Dual Core*.

3.2.2 Perancangan Struktur Tiga Dimensi (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine Sebagai Ligan

3.2.2.1 Modifikasi Bentuk dari (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine

Senyawa dimodelkan ke dalam struktur tiga dimensi. Modifikasi bentuk dari *(1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine* dilakukan dengan menggunakan *software ChemSketch* dari *ACDLabs*.

3.2.2.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur Tiga Dimensi Ligan

Optimasi geometri dan minimisasi energi struktur energi struktur tiga dimensi modifikasi *(1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine* (ligan) menggunakan *software MOE* yang dijalankan pada *single computer Intel Pentium Dual Core*. Algoritma yang digunakan adalah *conjugate gradient Polak-Ribiere*

dengan batas maksimum konvergensi gradien RMS 0,001 kcal/Å mol dan *parameter molecular mechanics force field MMFFx*.

3.2.3. Docking Antara Ligan dengan Protein M2 Channel

Proses *docking* diawali dengan preparasi file *docking* yang dilakukan dengan menggunakan program *docking* yang terdapat dalam *software* MOE. Baik ligan maupun protein, kepada keduanya ditambahkan hidrogen polar dan muatan Forcefield. File ligan disimpan dalam format mol dan protein M2 channel disimpan dalam format .moe untuk kemudian digunakan dalam preparasi parameter. Kalkulasi *docking* dijalankan dengan parameter algoritma Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Parameter ini disimpan dalam format .moe sebagai *file* yang digunakan untuk menjalankan proses *docking*. Proses *docking* dijalankan dengan menggunakan *software* MOE.

3.2.4. Analisis Docking

3.2.4.1. Penentuan Konformasi Kompleks Protein-Ligan Hasil Docking

Hasil kalkulasi *docking* dilihat pada *output* dalam format txt. Penentuan konformasi protein-ligan hasil *docking* dilakukan dengan memilih konformasi ligan yang memiliki energi ikatan yang paling rendah.

3.2.4.2. Energi Ikatan dan Konstanta Inhibisi (Ki)

Energi ikatan dan konstanta inhibisi hasil *docking* dilihat pada *output* dalam format *notepad*. Kompleks protein-ligan yang dipilih adalah kompleks yang memiliki nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi terkecil untuk kemudian dilakukan analisis lebih lanjut.

3.2.4.3. Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen yang terjadi pada kompleks protein M2 channel-ligan terbaik hasil *docking* diidentifikasi dengan menggunakan *software* MOE dengan *file input* dalam format .mdb.

3.2.4.4. Residu Kontak

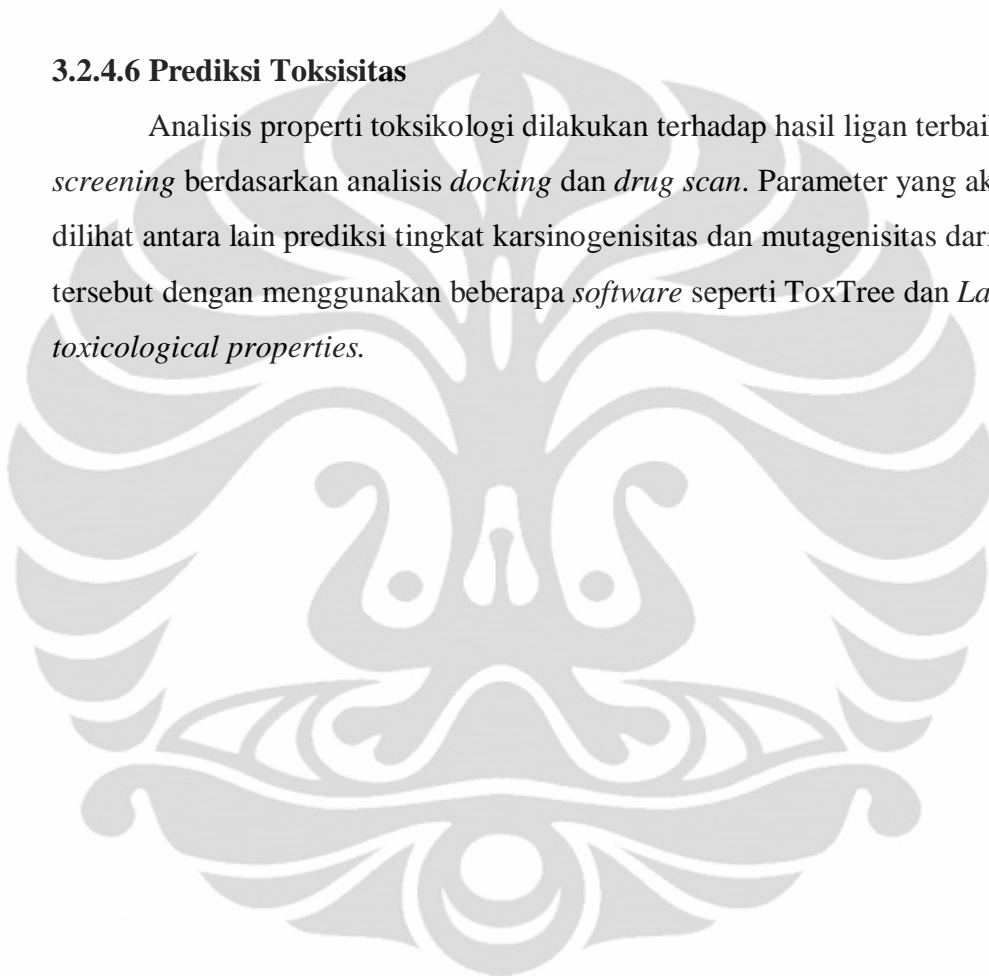
Residu kontak kompleks enzim-ligan hasil *docking* diidentifikasi dengan menggunakan *software* MOE.

3.2.4.5 Analisis Drug Scan

Analisis *drug scan* dilakukan terhadap hasil analisis *docking* ligan yang memiliki ΔG *binding* yang rendah sesuai distribusi normal, yaitu 20% dari energi terendah. Analisis *drug scan* dilakukan dengan membandingkan ligan terbaik hasil analisis *docking* terhadap aturan obat yang baik (Lipinsky's Rule of Five)

3.2.4.6 Prediksi Toksisitas

Analisis properti toksikologi dilakukan terhadap hasil ligan terbaik hasil *screening* berdasarkan analisis *docking* dan *drug scan*. Parameter yang akan dilihat antara lain prediksi tingkat karsinogenisitas dan mutagenisitas dari ligan tersebut dengan menggunakan beberapa *software* seperti ToxTree dan *Lazar toxicological properties*.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Persiapan Protein M2 *Channel* Influenza A (H1N1)

4.1.1 Pencarian Sekuen Protein M2 *Channel* Virus Influenza A (H1N1)

Sekuen dari protein M2 *Channel* yang akan dijadikan sebagai target protein ditentukan dengan menggunakan database influenza yang terdapat di situs resmi NCBI yaitu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/flu/>. Dalam situs ini terdapat *Influenza Virus Resources Database* yang memungkinkan kita untuk mendapat data virus influenza dengan spesifikasi yang kita inginkan. Spesifikasi ini meliputi tipe influenza, host dari virus, asal negara virus diisolasi, jenis sekuen protein yang diinginkan, serta subtype dari virus influenza. Spesifikasi- spesifikasi yang digunakan antara lain influenza tipe A, sekuen yang dipilih sekuen protein M2 *Channel* subtype H1N1 antara tahun 2009-2010 dari seluruh negara, dengan host manusia. Sekuen protein yang diambil adalah tipe *full length* dengan tujuan memudahkan dalam analisis selanjutnya (**Lampiran 2**). Dari penentuan ini didapatkan 173 sekuen protein M2 *Channel* dari berbagai negara.

4.1.2 *Multiple Sequence Alignment*

Dari 173 sekuen protein M2 *Channel* ditentukan satu sekuen untuk dijadikan target dengan menggunakan pensejajaran antar sekuen. Sekuen hasil dari pensejajaran ini merupakan sekuen yang paling mewakili dan akan dijadikan target pada penelitian ini. Penentuan ini dilakukan dengan *software online* clustalW2 dari situs resmi EB dengan melihat nilai kesamaan (*similarity score*) dari setiap perbandingan sekuen dengan nilai tertinggi 100 (**Lampiran 3,4**). Sekuen protein M2 *Channel* yang terpilih adalah sekuen yang memiliki nilai kesamaan tertinggi (100) paling banyak dari setiap perbandingan yaitu sekuen protein M2 *Channel* dari Addis Ababa, Ethiopia tahun 2009, dengan kode matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))] dan kode *genbank* ADM14979.1. Data NCBI menyebutkan bahwa sekuen >gi|303385772|gb|ADM14979.1| (**Lampiran 5**) merupakan sekuen yang diisolasi dari manusia, berjenis kelamin perempuan berusia 2 tahun. Sekuen ini

dikumpulkan pada tanggal 18 Agustus 2010 oleh Watler Reed Army Institute of Research, 503 Robert Grant Ave., Silver Spring, Maryland 20910, USA

4.1.3 *Homology modeling dan Identifikasi Template*

Dari hasil pensejajaran, sekuen protein M2 *channel* virus Influenza A H1N1 (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1)) dijadikan target protein untuk penentuan *template* struktur tiga dimensi protein M2 *channel* Influenza A (H1N1) .

Penentuan *template* struktur dimensi dari protein M2 *channel* Influenza A H1N1 (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1)) dengan menggunakan *software Hhpred* dari *Max Planck Institute* yang dapat diakses melalui *website*

<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>, sebagaimana dalam Lampiran 6. Hasil dari Hhpred menunjukkan bahwa protein M2 *channel* Influenza A H1N1 (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1)) memiliki kesamaan 100% dengan protein M2 *channel* dengan kode PDB 2KIH yang tersusun dari 43 residu asam amino.

Struktur kristal tersebut merupakan hasil dari penelitian dengan menggunakan *Solution NMR* yang dipublikasikan oleh Schnell *et al* pada tahun 2010

(Lampiran 7).



Gambar 4.1 Struktur kristal 3 dimensi protein M2 *channel*

Sumber: RSCB Protein Data Bank

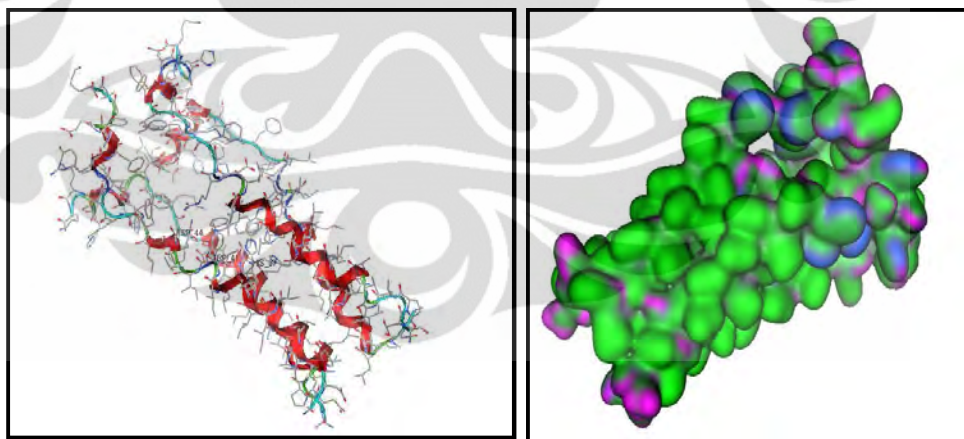
(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=2KIH>) diakses Januari 2011

4.1.4 *Visualisasi Sisi Aktif Protein M2 Channel*

Dari struktur tiga dimensi protein M2 *channel* yang didapat dari PDB dilakukan visualisasi untuk melihat posisi residu-residu yang memiliki fungsi penting dan akan digunakan sebagai *target residue* dalam proses *docking*.

Berdasarkan publikasi dari Du et al pada tahun 2010, diketahui bahwa aktivitas protein M2 *channel* ditentukan oleh tiga residu penting yaitu His37, Trp41 dan Asp44 seperti yang terlihat pada **Gambar 4.2**. Tiga residu ini disebut dengan *functional residue* karena masing-masing dari residu ini memiliki fungsi khusus yaitu His37 sebagai *pH sensor*, Trp41 sebagai *channel gate*, dan Asp44 sebagai *channel lock*. Ketiga residu tersebut memiliki posisi yang tetap (*highly conserved*) dalam M2 *channel* virus influenza A (Du et al., 2010).

Dalam struktur tersier protein atau enzim, residu asam amino yang bersifat *hidrofilik* terdapat di bagian *eksterior* (permukaan) sedangkan residu *hidrofobik* umumnya terdapat di bagian *interior* protein (Lehninger, 2004). Sifat hidrofobitas dan *hydrogen bond* dari protein M2 *channel* virus influenza A (H1N1) ditentukan dengan menggunakan *software MOE 2008.10*. Residu M2 *channel* pada **Gambar 4.2** divisualisasikan menggunakan program *map* dalam *software MOE 2008.10* dengan menggunakan permukaan (*surface*) *gaussian contact*. Residu yang bersifat *hidrofob* ditunjukkan dengan warna hijau, residu yang memiliki *H bond* berwarna ungu dan residu yang bersifat polar berwarna biru.



Gambar 4.2. Visualisasi Protein M2 *Channel* Influenza A (H1N1)

4.1.5 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur Tiga Dimensi Protein M2 *channel*

Proses optimasi geometri dan minimisasi energi dilakukan dengan menggunakan *software MOE 2008.10*. Tahap pertama yaitu dilakukan protonasi dengan *protonate3D*, hal ini dilakukan untuk mengubah enzim menjadi keadaan

terprotonasi. Aplikasi dari *protonate3D* ini digunakan untuk mengubah keadaan enzim menjadi dalam tingkat ionisasi dan menampilkan posisi atom hidrogen pada struktur kristal. Keberadaan atom hidrogen ini diperlukan dalam proses *molecular mechanics, dynamics*, ataupun perhitungan interaksi elektrostatik. Kemudian dilakukan pengaturan parameter pada menu *potential setup*. Parameter yang diatur antara lain *force field*. Force field yang dipilih yaitu *force field MMFF94x (Merck Molecular Force Field 94x)* yang sesuai untuk peptida, protein dan DNA. Penggunaan MMFF94x sebagai *forcefield* dinilai lebih baik dibandingkan *forcefield* yang lain (Halgren, 1999). Hal ini dikarenakan kepekaanya terhadap optimasi geometri enzim dengan ligan cukup tinggi. *Forcefield* MMFF94x juga dapat menempatkan atom hidrogen pada posisi yang paling tepat sehingga sangat berguna juga untuk validasi posisi atom hidrogen dalam keadaan solvasi oleh molekul air. Jenis solvasi yang dipilih yaitu *gas phase* karena dalam tahapan molecular docking enzim dibuat dalam keadaan rigid maka diperlukan penghilangan energi solvasi (Fadilah,2010)

Kemudian dilakukan penambahan muatan (*partial charge*) dengan menggunakan parameter *method current force field*. Tujuan penambahan muatan parsial ini untuk meyakinkan bahwa muatan protein terprotonasi tepat dengan keadaan alaminya sehingga proses *docking* akan berjalan sesuai dengan keadaan alaminya. Perlakuan *hydrogen fix* digunakan untuk memperbaiki struktur molekul apabila terdapat hidrogen yang hilang.

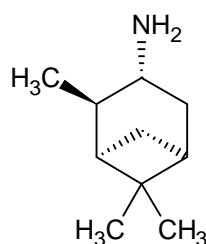
Proses selanjutnya meminimisasi energi protein dengan menggunakan software MOE 2008.10. Minimisasi energi dilakukan dengan nilai gradien RMS 0.05 kkal/Å yang sesuai untuk protein. Tujuan dilakukannya minimisasi energi yaitu menghilangkan interaksi yang tidak disukai (*bad contact*) dari struktur. Nurbaiti (2009) menyatakan bahwa koordinat awal suatu biomolekul umumnya diperoleh dari hasil kristalografi sinar- X atau pemodelan struktur tiga dimensi yang jarak antar satu dengan lainnya sangat dekat ataupun sangat jauh dari posisi kesetimbangan. Adanya ketidaksesuaian geometri tersebut menyebabkan terjadinya interaksi yang tidak disukai (*bad contact*) maupun efek-efek sterik berenergi tinggi yang dapat mengakibatkan sistem yang disimulasikan menjadi tidak stabil. Maka setelah parameter simulasi disesuaikan hingga mendekati

keadaan nyata, dilakukan proses minimisasi sehingga posisi geometri atom yang tidak sesuai dapat dikembalikan sehingga dihasilkan energi potensial terendah bagi sistem (Nurbaiti, 2009).

4.2 Persiapan Ligan

4.2.1 Penentuan Ligan sebagai Inhibitor

Penentuan ligan sebagai inhibitor protein M2 *channel* dilakukan dengan cara memodifikasi gugus aktif dari senyawa isopinocampheylamine. Menurut penelitian Shaogao Zeng dkk, senyawa Isopinocampheylamine ini merupakan inhibitor protein M2 *channel* yang dapat menggantikan posisi amantadine dan rimantadine sebagai inhibitor protein M2 *channel*. Mekanisme dari inhibitor protein M2 *channel* yaitu menghalangi aktivitas dari saluran ion protein M2 *channel* virus influenza A. Mekanisme ini menghambat replikasi virus dengan memblokir aliran proton. Pada amantadine dan rimantadine yang berperan penting sebagai penghalang aliran proton yaitu gugus amino. Gugus amino tersebut juga berperan sebagai *pharmacopore*. *Pharmacopore* yaitu gugus yang berperan dalam interaksi, sedangkan gugus adamantilnya berperan sebagai kerangka yang mempertahankan efek sterik. Berdasarkan *structure-activities relationship* terhadap amantadine, senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine memiliki struktur yang dapat berperan dalam menghambat protein M2 *channel* (Zeng et al,2010). Gugus amina primer pada senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dapat memiliki peran yang sama dengan gugus amino pada senyawa amantadine yaitu sebagai penghalang dari aliran proton pada virus influenza A. Cincin bisiklik dari senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine juga memiliki peran yang sama dengan gugus adamantil pada senyawa amantadine yaitu sebagai kerangka yang memberikan efek sterik.



Gambar 4.3 Struktur (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine

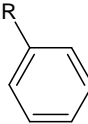
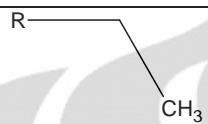

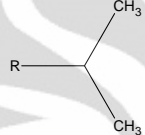
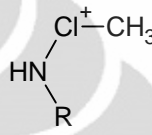

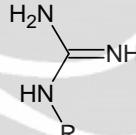
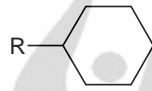
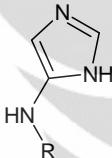
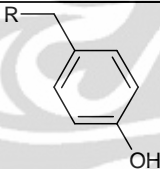
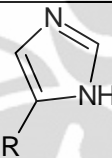
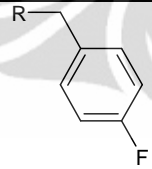
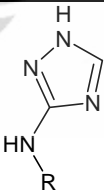
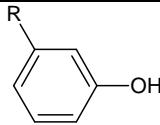
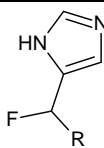
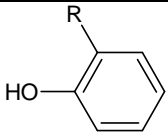
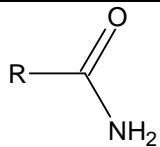
Untuk meningkatkan potensi dari senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine tersebut, pada penelitian ini dilakukan modifikasi terhadap gugus amina primer yang ada pada senyawa tersebut. Modifikasi terhadap senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dilakukan dalam dua bentuk. Bentuk pertama yaitu memodifikasi gugus amina primer menjadi amina sekunder. Modifikasi gugus amina primer menjadi gugus amina sekunder ini diharapkan dapat meningkatkan aktivitas senyawa tersebut. Sedangkan bentuk kedua yaitu bentuk imina. Dalam bentuk modifikasi ini diharapkan ikatan C=N akan memiliki interaksi yang lebih baik dengan protein target.



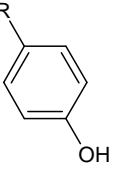
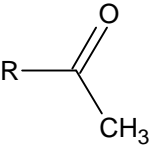
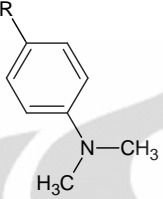
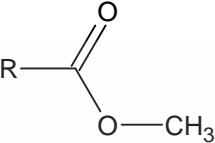
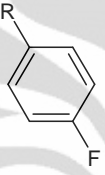
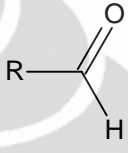
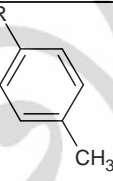
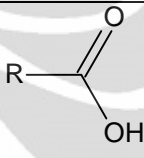
Gambar 4.4 Modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine

Gugus aktif yang digunakan untuk memodifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dipilih berdasarkan pada inhibitor protein M2 *channel* yang telah disintesis pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Balannik *et al* pada tahun 2009 dan Wenhui Hu tahun 2010. Gugus aktif yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Pada penelitian tersebut terbukti bahwa gugus aktif ini efektif dalam menghambat proton M2 *channel* virus influenza A H1N1. Dari hasil modifikasi gugus aktif dari isopinocampheylamine diperoleh 52 kandidat ligan yang akan dilakukan proses *screening* untuk mendapatkan tiga kandidat ligan yang terbaik sebagai inhibitor protein M2 *channel*.

Tabel 4.1 Struktur gugus fungsi

No	Struktur Gugus Fungsi	No	Struktur Gugus Fungsi
1	$R-CH_3$	14	
2		15	
3		16	
4		17	
5		18	
6		19	
7		20	
8		21	
9		22	

Tabel 4.1 Struktur gugus fungsi (lanjutan)

10		23	
11		24	
12		25	
13		26	

4.2.2 Perancangan Struktur Tiga Dimensi Ligan

Desain struktur tiga dimensi modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dilakukan dengan menggunakan software ACDLabs. Desain ini dilakukan untuk mempersiapkan struktur tiga dimensi modifikasi senyawa isopinocampheylamine sebagai ligan yang akan digunakan dalam proses molecular docking. Dengan menggunakan *software* ACDlab dapat menggambarkan posisi gugus senyawa bioaktif sesuai dengan hasil isolasi.

Format penyimpanan rancangan modifikasi senyawa isopinocampheylamine yaitu dalam bentuk MDLmolfile. Kemudian hasil format rancangan ligan ini diubah menjadi MDLmol menggunakan *software* vega zz. Hal ini dimaksudkan agar rancangan ligan-ligan tersebut dapat terbaca oleh *software* MOE 2008.10.

4.2.3 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur Tiga Dimensi

Ligan

Ligan yang telah memiliki format *MDLmol* selanjutnya diimport ke dalam *database viewer (dv) MOE 2008.10* untuk dilakukan optimasi geometri dan minimisasi energi. Optimasi geometri diawali dengan melakukan proses *wash* pada rancangan ligan-ligan yang terdapat pada *database viewer MOE 2008.10*. Tujuannya yaitu untuk memperbaiki posisi atom hidrogen yang terdapat pada ligan dan juga untuk memperbaiki struktur ligan. Kemudian dilakukan optimasi menggunakan *force field MMFF94x*. Kemudian dilakukan pengaturan muatan parsial ligan menggunakan *partial charge*, dengan parameter *method* yang digunakan adalah *MMFF94x*. Parameter *method* yang digunakan adalah *MMFF94x* yang sesuai untuk peptida, protein dan DNA. Kemudian dilakukan proses minimasi energi dengan tujuan untuk menghilangkan interaksi-interaksi yang tidak diinginkan. Proses minimisasi energi pada ligan dilakukan dengan RMS gradient 0,001 kcal/Å (Singh *et al.*, 2007). Tujuan dari proses minimasi energi ini sama dengan proses minimasi protein yaitu menghilangkan interaksi-interaksi yang tidak diinginkan atau *bad contact*.

4.3 Molecular Docking

Setelah protein M2 *channel* dan ligan di optimasi dilakukan proses *molecular docking*. Proses *molecular docking* ini dilakukan menggunakan software MOE 2008.10 dengan program dock. *Molecular docking* dirancang untuk mencari konformasi ikatan yang tepat antara ligan dengan reseptor. Proses *docking* dilakukan agar ligan dapat membentuk kompleks dan berada pada enzim dengan konformasi yang paling optimal (Fadillah., 2010). Pada penelitian ini proses *docking* juga digunakan untuk *screening* dari sejumlah kandidat inhibitor sehingga diperoleh inhibitor terbaik yang dapat terikat secara geometri dan energetis dengan sisi aktif maupun *binding site* protein (Teodoro *et al.*, 2001) serta potensial untuk dikembangkan sebagai obat. Proses *docking* pada penelitian ini dilakukan antara 52 ligan kandidat dan 3 ligan standar yaitu amantadine, rimantadine, dan isopinocampheylamine terhadap *functional site* protein M2 *channel* yaitu His37, Trp41, dan Asp44. Pemilihan posisi pada proses *docking* dapat dilakukan pada menu *sequence editor*. Pada proses *docking* protein diberi

kondisi yang rigid sedangkan ligan dikondisikan pada keadaan yang fleksibel sehingga dapat bebas bergerak maupun berotasi.

Parameter yang diatur dalam proses *docking* meliputi pengaturan fungsi *scoring* menggunakan London dG. Fungsi *scoring* akan mengukur aktifitas biologi berdasarkan ikatan dan interaksi yang terjadi antara ligan dengan target protein (Nylander, 2007).

Fungsi *scoring* pada *MOE 2008.10* adalah fungsi *scoring force-field based*. Fungsi *scoring* ini biasanya menghitung dua energi, yaitu energi interaksi ligan-reseptor dan energi internal ligan. (Nylander, 2007). Fungsi *scoring* yang digunakan adalah London dG dengan *retain* (tampilan) sebesar 100, tanpa duplikasi (Mazur *et al.*, 2009). *Retain* bertujuan untuk mengatur jumlah konformasi terbaik ligan yang ingin ditampilkan. London dG menunjukkan besarnya energi bebas Gibbs ikatan ($\Delta G_{\text{binding}}$) dari tiap posisi antara ligan dengan enzim yang dihasilkan dengan persamaan:

$$\Delta G = c + E_{\text{flex}} + \sum_{\text{h-bonds}} c_{\text{HB}} f_{\text{HB}} + \sum_{\text{m-lig}} c_{\text{M}} f_{\text{M}} + \sum_{\text{atoms } i} \Delta D_i$$

dimana c = rerata entropy rotasi dan translasi yang didapat atau dilepaskan, E_{flex} = energi yang menyatakan berkurangnya fleksibilitas dari ligan, f_{HB} = ukuran ketidaksempurnaan geometri dari ikatan hidrogen, c_{HB} = energi dari ikatan hidrogen ideal, f_{M} = ukuran ketidaksempurnaan geometri dari *metal ligations*, c_{M} = energi dari *ideal metal ligation*, dan D_i = energi disolvasi atom ke- i (MOE tutorial, 2008).

Parameter lain yang dilakukan dalam proses *docking* dengan menggunakan *software MOE.2008.10* adalah pengaturan *triangle matcher*. *Triangle matcher* merupakan *placement method default* dari MOE yang digunakan untuk menunjukkan gerakan acak (*random*) ligan dalam sisi aktif enzim untuk menghasilkan orientasi ikatan yang optimal. *Triangle matcher* digunakan untuk mengorientasikan ligan pada sisi aktif berdasarkan *charge group* dan *spatial fit* (Cook, *et. al.*, 2009). Pada *triangle matcher* digunakan pose sebanyak 1000 yang merupakan *default* dari program *MOE-Dock*. (Feher *et al.*, 2009). Tahapan *refinement* digunakan untuk melakukan perbaikan lebih lanjut.

Refinement yang dilakukan menggunakan *force field* dengan alasan hasil yang diperoleh akan lebih akurat bila dibandingkan dengan *GridMin* yang menggunakan kalkulasi elektrostatik pada proses minimisasi (MOE, 2008). Pengaturan *default* dari *refinement forcefield* menggunakan *pocket cut off* 6Å, yaitu jarak reseptor yang diikutsertakan pada proses *docking* (Feher *et al.*, 2009). Selanjutnya dilakukan *retain* (tampilan) terakhir hasil *refinement* sebanyak satu sehingga diperoleh hanya satu konformasi yang paling optimal dari tiap ligan.

4.4 Analisis Docking

Terdapat tiga hal penting yang dihasilkan pada simulasi *docking*, yaitu pertama menghasilkan orientasi dan posisi suatu ligan sebagai inhibitor terhadap enzim, kedua mengidentifikasi senyawa yang memiliki afinitas terhadap protein dari *database* senyawa yang tersedia, dan yang ketiga memprediksi afinitas yang dimiliki suatu molekul terhadap enzim target simulasi *docking*. Ketiga hal tersebut berupa fungsi *scoring* (London dG) yang diestimasi sebagai nilai energi bebas pengikatan $\Delta G_{binding}$ dalam Kkal/mol.

Dalam proses *docking* ini dilakukan 4 kali tahap *screening* untuk mendapatkan tiga ligan terbaik. Proses *screening* pertama dilakukan terhadap 52 ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dan ligan amantadine, rimantadine dan isopinocampheylamine sebagai standar. Hasil *screening* tersebut seperti terlihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2. Hasil *screening* 52 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 channel

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	LIGAND B18.mol	38	-16.5286	0.0000	-49.7426	-6.3858	-16.5286
2	LIGAND A16.mol	10	-16.4922	1.7603	-57.1291	-6.6757	-16.4922
3	LIGAND B16.mol	36	-16.1847	0.0000	-36.3241	-4.9517	-16.1847
4	LIGAND B20.mol	41	-15.6958	1.6000	-68.1786	-6.3974	-15.6958
5	LIGAND A6.mol	25	-15.2034	1.0000	-58.0759	-7.7315	-15.2034
6	LIGAND B6.mol	51	-15.1754	0.8000	-63.4540	-6.2106	-15.1754
7	LIGAND B8.mol	53	-14.9114	2.4000	-45.6628	-6.6613	-14.9114
8	LIGAND A10.mol	4	-14.8768	1.0000	-48.1587	-6.1950	-14.8768
9	LIGAND B11.mol	31	-14.7808	0.4000	-48.7418	-5.1042	-14.7808
10	LIGAND B10.mol	30	-13.6394	2.0000	-58.1691	-7.2897	-13.6394
11	LIGAND B21.mol	42	-13.5495	0.4000	-58.7096	-5.5154	-13.5495
12	LIGAND A4.mol	23	-13.3996	0.8000	-46.6974	-6.5587	-13.3996
13	LIGAND A14.mol	8	-13.3570	0.6033	-57.2450	-5.7027	-13.3570
14	LIGAND B5.mol	50	-13.2893	0.0000	-51.5576	-5.1877	-13.2893
15	LIGAND A9.mol	28	-13.2408	1.0000	-48.2096	-6.6542	-13.2408
16	LIGAND A13.mol	7	-12.9213	0.6032	-55.5932	-5.5671	-12.9213
17	LIGAND B9.mol	54	-12.8960	1.0000	-59.4343	-6.7997	-12.8960
18	LIGAND B3.mol	48	-12.8554	0.0000	-37.1451	-4.9226	-12.8554
19	LIGAND B13.mol	33	-12.7630	2.4000	-61.6677	-5.5986	-12.7630
20	LIGAND A8.mol	27	-12.7616	0.0000	-58.5237	-6.2575	-12.7616
21	LIGAND B23.mol	44	-12.7611	0.0000	-49.8918	-5.0722	-12.7611
22	LIGAND B12.mol	32	-12.7065	2.0000	-51.4337	-5.2838	-12.7065
23	LIGAND B7.mol	52	-12.4567	0.0000	-58.9520	-5.3612	-12.4567
24	LIGAND A3.mol	22	-12.4545	0.6000	-41.2316	-6.4756	-12.4545
25	LIGAND A12.mol	6	-12.4097	0.6008	-56.5655	-5.2234	-12.4097
26	LIGAND B4.mol	49	-12.3946	0.0000	-47.0944	-5.1511	-12.3946
27	LIGAND A2.mol	14	-12.3150	0.8000	-38.7959	-7.3347	-12.3150
28	LIGAND B2.mol	40	-12.0491	0.0000	-41.2056	-5.0140	-12.0491
29	LIGAND A18.mol	12	-12.0423	0.0002	-56.7587	-5.9984	-12.0423

Dari hasil *docking* 52 ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dipilih 20 ligan terbaik berdasarkan parameter nilai energi bebas Gibbs dan interaksi dengan *functional site*. Selanjutnya dari 20 ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine dilakukan *docking* ulang dengan ligan standar amantadine, rimantadine dan isopinocampheylamine untuk memperoleh 10 ligan isopinocampheylamine modifikasi yang memiliki energi Gibbs terendah, interaksi yang baik dengan *functional site* dan konstanta inhibisi yang besar. Hasil *docking* tersebut diatas digunakan sebagai *screening* kedua (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Hasil *screening* 20 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 channel

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	LIGAND A16.mol	3	-16.9617	0.4000	-41.8696	-6.1270	-16.9617
2	LIGAND B18.mol	15	-16.5962	0.0000	-53.7681	-8.2621	-16.5962
3	LIGAND B8.mol	20	-15.7198	2.4000	-57.7799	-7.3775	-15.7198
4	LIGAND B9.mol	21	-15.5682	1.6000	-52.8094	-7.3853	-15.5682
5	LIGAND A8.mol	10	-14.7013	0.0015	-56.4923	-7.1863	-14.7013
6	LIGAND A9.mol	11	-14.5003	1.0014	-57.4996	-6.6083	-14.5003
7	LIGAND A10.mol	2	-14.2939	1.0000	-45.7149	-6.7791	-14.2939
8	LIGAND B6.mol	19	-13.9123	0.0000	-63.8601	-7.7523	-13.9123
9	LIGAND B1.mol	12	-13.8677	2.0000	-47.5466	-7.7361	-13.8677
10	LIGAND A6.mol	9	-13.6413	1.0000	-61.7227	-9.3607	-13.6413
11	LIGAND B17.mol	14	-13.5458	0.0002	-53.0481	-7.3821	-13.5458
12	LIGAND B20.mol	16	-13.3991	0.4000	-72.8108	-6.6769	-13.3991
13	LIGAND A20.mol	6	-12.9472	0.7251	-56.2541	-7.4838	-12.9472
14	LIGAND A2.mol	5	-12.8484	1.4009	-45.1099	-6.8331	-12.8484
15	LIGAND B16.mol	13	-12.8315	0.0000	-42.7482	-5.3013	-12.8315
16	LIGAND A21.mol	7	-11.7208	1.6774	-46.3096	-8.1444	-11.7208
17	LIGAND A17.mol	4	-10.6855	0.6000	-48.0832	-6.7143	-10.6855
18	LIGAND A23.mol	8	-9.3835	0.0000	-44.6542	-5.4156	-9.3835
19	LIGAND B23.mol	18	-9.3531	0.0000	-42.6493	-5.9145	-9.3531
20	amantadine.mol	1	-9.0675	0.0000	-32.0680	-5.4526	-9.0675
21	isopino.mol	23	-8.8726	0.0000	-19.1800	-6.3767	-8.8726
22	LIGAND B22.mol	17	-8.7406	0.0000	-48.0587	-5.8634	-8.7406
23	rimantadine.mol	22	-7.9750	0.0000	-23.9813	-6.0863	-7.9750

Dari 10 ligan terpilih tersebut dilakukan *docking* ulang dengan ligan standar amantadine, rimantadine dan isopinocampheylamine untuk memperoleh 5 ligan isopinocampheylamine modifikasi yang memenuhi parameter seperti sebelumnya. Hasil *docking* ini digunakan sebagai *screening* ketiga sebagaimana Tabel 4.4. Hasil interaksi dua dimensi dari 10 ligan terbaik dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 4.4. Hasil *screening* 10 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 channel

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	LIGAND A16.mol	3	-17.0863	1.0000	-42.4419	-6.8778	-17.0863
2	LIGAND B18.mol	8	-16.1973	0.0000	-57.1420	-8.5003	-16.1973
3	LIGAND B8.mol	11	-15.2075	2.4000	-66.5038	-7.1885	-15.2075
4	LIGAND A8.mol	5	-14.8853	0.6000	-59.1152	-8.0212	-14.8853
5	LIGAND B6.mol	10	-14.7071	0.4000	-54.6278	-6.9599	-14.7071
6	LIGAND A9.mol	6	-14.5031	1.0000	-42.2896	-6.9217	-14.5031
7	LIGAND B10.mol	7	-14.2874	2.4000	-73.9501	-8.1691	-14.2874
8	LIGAND A10.mol	2	-14.2161	0.0000	-53.8591	-7.2731	-14.2161
9	LIGAND B20.mol	9	-12.8394	0.0000	-63.7363	-6.3473	-12.8394
10	LIGAND A20.mol	4	-12.6372	0.4000	-57.5539	-7.1064	-12.6372
11	isopino.mol	13	-10.3363	0.0000	-32.2210	-5.9212	-10.3363
12	amantadine.mol	1	-8.4027	0.0000	-22.5121	-5.6519	-8.4027
13	rimantadine.mol	12	-7.9519	0.0000	-14.4981	-5.7096	-7.9519

5 ligan dari hasil *screening* ketiga dilakukan *docking* ulang untuk memperoleh 3 ligan terbaik dengan ligan standar yang sama. *Docking* ulang ini dilakukan untuk memperoleh 3 ligan terbaik dengan interaksi yang terbaik antara ligan dan reseptor yaitu berupa ikatan hidrogen yang terjadi antara residu asam amino pada *functional site* protein M2 channel dengan ligan dan konstanta inhibisi yang besar. Hasil *docking* tersebut diatas digunakan sebagai *screening* keempat sebagai mana

Tabel 4.5

Tabel 4.5. Hasil *screening* 5 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 channel

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	LIGAND B18.mol	5	-16.2133	0.0000	-52.3222	-8.1741	-16.2133
2	LIGAND A9.mol	4	-13.1129	0.8000	-51.4135	-6.9536	-13.1129
3	LIGAND B20.mol	6	-12.6620	0.4000	-68.9868	-7.2626	-12.6620
4	LIGAND A10.mol	2	-12.4217	0.0000	-51.1156	-7.5309	-12.4217
5	LIGAND A20.mol	3	-12.0666	2.8556	-63.0921	-7.8577	-12.0666
6	isopino.mol	8	-8.2232	0.0000	-12.7476	-6.6267	-8.2232
7	rimantadine.mol	7	-8.1126	0.0000	-44.5834	-6.6812	-8.1126
8	amantadine.mol	1	-6.7294	0.0000	-27.5500	-7.6419	-6.7294

Dari *docking* kelima ligan tersebut didapat kan tiga ligan terbaik berdasarkan parameter nilai energi bebas, interaksi dengan *functional site* dan nilai konstanta inhibisinya. Tiga kandidat ligan terbaik ini di *docking* kembali untuk melihat perbandingannya dengan ligan standar. Berikut hasil *docking* tiga ligan terbaik dan ligan standar (**Tabel 4.6**).

Tabel 4.6. Hasil *docking* 3 ligan (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine termodifikasi dan standar dengan protein M2 channel

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	LIGAND B18.mol	3	-16.4227	0.0000	-55.2865	-7.5340	-16.4227
2	LIGAND B20.mol	4	-12.7748	0.0000	-60.1215	-6.8231	-12.7748
3	LIGAND A20.mol	2	-12.1688	1.0000	-64.6367	-8.3877	-12.1688
4	isopino.mol	6	-8.9150	0.0000	-20.6797	-6.3690	-8.9150
5	rimantadine.mol	5	-7.9618	0.0000	-38.3419	-8.7524	-7.9618
6	amantadine.mol	1	-6.8767	0.0000	-17.5871	-6.5156	-6.8767

4.4.1 Energi Bebas Ikatan ($\Delta G_{binding}$) dan Konstanta Inhibisi

Kecenderungan atau kekuatan dari suatu ikatan atau dapat disebut sebagai affinitas dari ligan terhadap suatu reseptor atau enzim dapat ditentukan dengan melihat nilai $\Delta G^{\circ} binding affinity$ (kcal/mol) yang dihasilkan pada saat kompleks protein-ligan terbentuk. Affinitas yang tinggi dari suatu ligan terhadap protein dihasilkan dari gaya intermolekular yang besar antara ligan dengan protein tersebut sedangkan afinitas yang rendah dari suatu ligan terhadap protein dihasilkan dari suatu gaya intermolekular yang kecil antara kompleks protein-ligan tersebut. Nilai energi bebas ikatan ($\Delta G_{binding}$) terkuantifikasi oleh konstanta aktivitas biologis K_A dengan asumsi di dalam kondisi termodinamika yang setimbang dalam bentuk formasi kompleks protein-ligan [EI]. Terdapat hubungan antara nilai energi bebas ikatan ($\Delta G_{binding}$) dengan konstanta inhibitor (K_i) yang nilainya mengikuti persamaan termodinamik berikut (Kitchen *et al.*, 2004).

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K_A \quad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Berdasarkan pada perumusan tersebut, semakin rendah atau terjadi kenaikan nilai negatif dari harga $\Delta G_{binding}$ maka ikatan kompleks protein-ligan akan semakin kuat. Hal ini karena kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada kompleks protein-ligan dapat dilihat dari besarnya energi bebas yang dilepaskan saat interaksi pada kompleks protein-ligan terbentuk.

Dalam *software* MOE, energi bebas *Gibbs* (ΔG) dilambangkan dengan S yang menunjukkan jumlah total dari tahapan akhir *docking*. Nilai S memiliki *score* yang sama dengan E_{refine} dimana E_{refine} merupakan energi total dari ikatan kompleks *docking*. Hasil *docking* menunjukkan bahwa dari 52 senyawa kandidat ligan diperoleh tiga ligan terbaik yang memiliki nilai $\Delta G_{binding}$ yang negatif.

Tabel 4.7. Data energi bebas ikatan hasil simulasi *docking*

Ligan	ΔG binding (kkal/mol)	pKi
Ligan B18	-16,4227	5,911
Ligan B20	-12,7748	5,436
Ligan A20	-12.1688	6,292
*Isopinocampheylamine	-8,9150	4.966
*Rimantadine	-7,9618	4,872
*Amantadine	-7,6768	4,334

Keterangan: * : Standar

Dari Tabel 4.7 terdapat tiga ligan yaitu ligan A20, ligan B18, dan ligan B20 yang memiliki nilai energi bebas Gibbs (ΔG) lebih negatif dari standar amantadine, rimantadine dan isopinocampheylamine.

Selain itu dari tabel 4.7 dapat dilihat pula nilai konstanta inhibisinya. Ki disini disebut sebagai konstanta disosiasi penguraian yang dapat memberikan gambaran mengenai afinitas antara ligan dan penguraian. Konstanta ini *reciprocal* dari konstanta kesetimbangan, maka Ki dirumuskan sebagai berikut:



$$K_i = \frac{[E][L]}{[EL]}$$

dengan E adalah enzim, L adalah ligan dan EL adalah kompleks enzim-ligan. Semakin kecil nilai Ki, maka kesetimbangan reaksi cenderung ke arah pembentukan kompleks. Kompleks protein-ligan dikatakan memiliki afinitas ikatan yang baik jika memiliki nilai Ki pada skala mikromolar. Data hasil *docking* menunjukkan bahwa semua ligan memiliki estimasi nilai Ki pada skala ini. Data *docking* dari *software MOE* menunjukkan nilai konstanta inhibisi dalam pKi. Artinya semakin besar nilai pKi, maka ligan memiliki Ki yang kecil. Maka nilai pKi ini dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kestabilan dalam pembentukan kompleks protein dengan ligan. Dari hasil *docking* nilai pKi dari ligan A20 yaitu 6.292, nilai ini menunjukkan bahwa ligan A20 memiliki afinitas

dan berinteraksi lebih kuat dalam membentuk kompleks dengan protein M2 *channel* dibandingkan dengan ligan lainnya.

4.4.2 Ikatan Hidrogen dan Kontak Residu

Selain dari nilai dari energi bebas Gibbs atau ΔG dan konstanta inhibisi, parameter yang dapat dianalisis dari proses *docking* yaitu interaksi antara protein dan ligan yang terbentuk. Salah satu interaksinya yaitu ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen didefinisikan sebagai gaya intermolekul atau intramolekul yang terjadi antara atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi dengan atom hidrogen yang terikat secara kovalen pada suatu atom elektronegatif (Nurbaiti, 2009). Kriteria terjadinya ikatan hidrogen ini adalah jika jarak antara hidrogen dengan atom elektronegatif berada dalam rentang 2,5 – 3,5 Å. Ikatan hidrogen yang terjadi pada kompleks protein-ligan dapat diidentifikasi dan dianalisis dalam program *ligand interaction* dengan menggunakan *software* MOE 2008.10.

Tabel 4.8. Residu asam amino protein M2 *channel* yang membentuk ikatan hidrogen dengan ligan

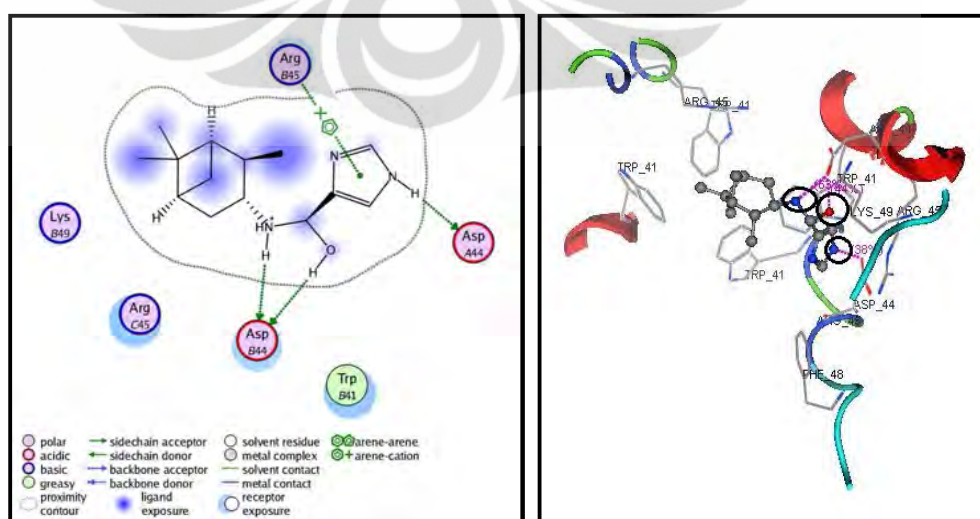
Ligan	Ikatan Hidrogen dengan protein M2 <i>channel</i>	Kontak Residue dengan protein M2 <i>channel</i>
*Amantadine	Asp A44	AspA44 , LeuA40
*Rimantadine	-	Phe A54, Phe A48, Ile D51
*Isopinocampheylamine	Asp B44	Asp B44 , Phe B47
Ligan A20	Asp A44, Asp B44, Asp B44	Asp A44, Asp B44, Asp B44 , Arg B45, Lys B49, Arg C45, Trp
Ligan B18	Asp D44, Asp D44, Arg A45	Asp D44, Asp D44 , Arg A45, Phe D48, Phe D48, Phe D48
Ligan B20	Asp C44, Arg D45, Phe C48	Trp D41, Arg D45 , Phe C47, Lys C49, Asp C44 , Arg D45, Phe C48

Ket.: * : Standar

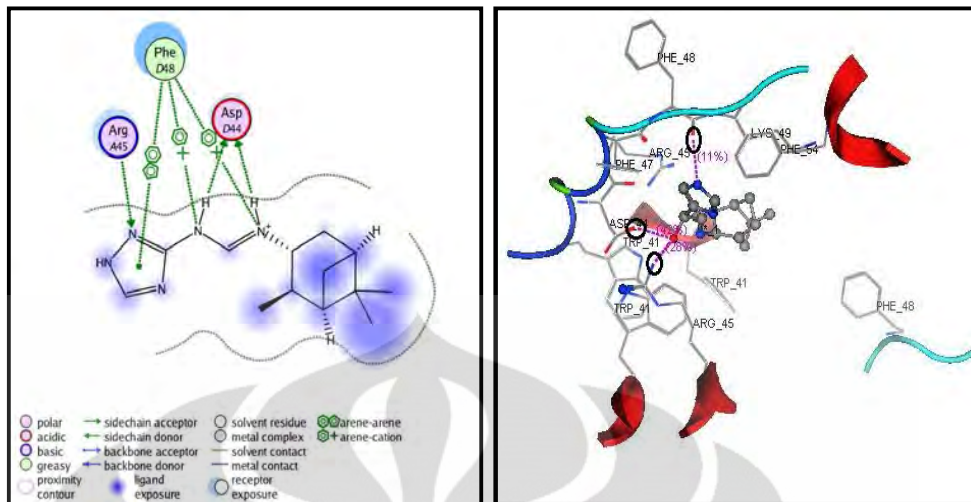
Residu yang dicetak merah merupakan residu functional site protein M2 channel.

Dari hasil analisis ikatan hidrogen dari proses *docking* terlihat bahwa interaksi ikatan hidrogen antara protein M2 *channel* dengan ligan standar lebih sedikit dibandingkan dengan ikatan hidrogen antara protein M2 *channel* dengan tiga ligan terbaik. Hal tersebut membuktikan bahwa ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine memiliki aktivitas yang lebih baik. Dari hasil analisis ikatan hidrogen dapat terlihat bahwa ligan-ligan tersebut cenderung berikatan dengan Asp44 yang merupakan target residu. Residu Asp44 ini berperan sebagai *channel lock* pada protein M2 *channel*. Pada keadaan normal residu Asp44 ini berikatan dengan residu Trp41 untuk menjaga saluran ion tertutup. Akan tetapi pada pH yang lebih rendah kedua residu ini dapat terprotonasi dan melemahkan ikatan antara keduanya sehingga saluran ion dapat terbuka dan dapat membantu virus untuk mengeluarkan materi genetiknya. Dengan adanya interaksi residu Asp44 dengan ligan, residu ini akan lebih sulit terprotonasi sehingga dapat mempertahankan konformasi tertutupnya. Selain sebagai *channel lock* residu Asp44 ini juga berperan sebagai tempat keluarnya proton pada protein M2 *channel* sehingga residu ini juga dapat menghalangi aliran proton. Dengan banyaknya ikatan hidrogen dengan residu Asp44 diharapkan fungsi inhibisi dari ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine semakin baik. Pada tabel terlihat bahwa interaksi ikatan hidrogen dengan residu Asp44 paling banyak yaitu dengan ligan A20. Pada ligan A20 terjadi tiga ikatan hidrogen dengan residu Asp44 pada protein M2 *channel*. Dua ikatan pada rantai B dan satu ikatan pada rantai A. Pada ligan B18 terjadi dua ikatan hidrogen dengan residu Asp44 protein M2 *channel* di rantai D. Sedangkan pada ligan B20 terjadi satu ikatan hidrogen dengan residu Asp44 rantai C. Dari hasil interaksi ligan standar juga terlihat bahwa amantadine dan rimantadine kehilangan efektivitasnya. Pada rimantadine tidak terjadi ikatan hidrogen dengan protein M2 *channel*. Kontak residu antara rimantadine dengan protein M2 *channel* pun tidak dengan *functional site*. Pada interaksi antara isopinocampheylamine dengan protein terlihat adanya satu ikatan hidrogen dengan *functional site* Asp44 dan kontak residu hanya pada residu Leu40 yang bukan merupakan *functional site* pada protein M2 *channel*.

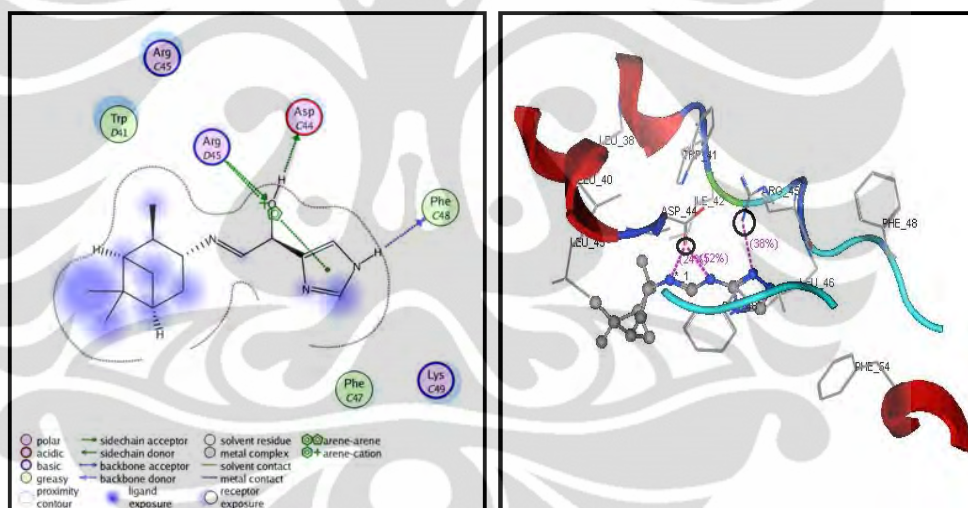
Selain dari interaksi ikatan hidrogen, analisis hasil *docking* juga dapat dilihat dari kontak residu antara protein dengan ligan. Interaksi non-kovalen atau non-ikatan (*non-bonded interaction*) yang terjadi antara protein dan ligan dapat meningkatkan afinitas ligan terhadap protein. Interaksi non-ikatan merepresentasikan interaksi fleksibel di antara pasangan atom dan partikel. Dua jenis interaksi non-ikatan paling umum yang dapat mengakibatkan perubahan energi potensial adalah interaksi elektrostatik dan interaksi van der Waals. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis terhadap kontak residu kompleks protein-ligan hasil simulasi *docking*. Sehingga dapat diketahui residu-residu enzim yang berinteraksi dengan ligan. Dari hasil analisis terlihat bahwa kontak residu dari ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine lebih baik dibandingkan dengan ligan standar. Selain interaksi dengan *functional site* Asp44, ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine juga memiliki kontak residu dengan *functional site* lainnya yaitu residu Trp41 pada ligan A20 dan B20. Hal ini diharapkan dapat meningkatkan efektivitas dari inhibitor protein M2 *channel* ini. Berikut akan ditampilkan visualisasi dua dimensi dan tiga dimensi dari interaksi kompleks kandidat ligan terbaik dan ligan standar dengan protein M2 *channel*. Visualisasi dua dimensi ditampilkan pada bagian kiri sedangkan visualisasi tiga dimensi di sebelah kanan. Pada visualisasi 3 dimensi ikatan hidrogen antara ligan dengan protein ditandai dengan garis putus-putus berwarna ungu.



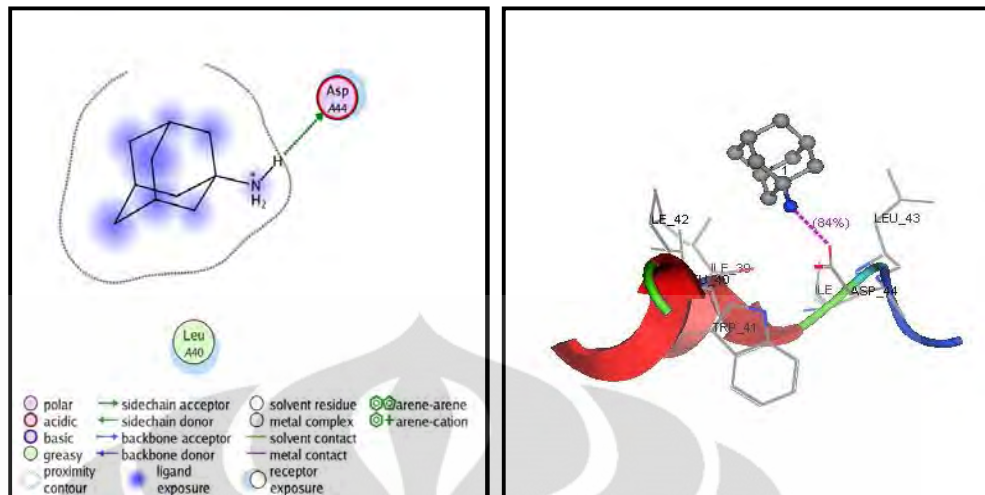
Gambar 4.5 . Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligan A20 dengan protein M2 *channel*



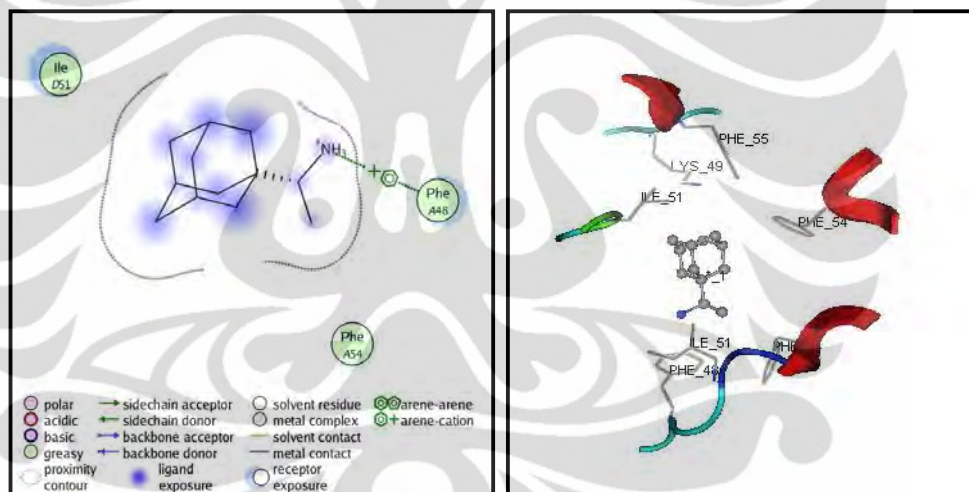
Gambar 4.6 . Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligand B18 dengan protein *M2 channel*



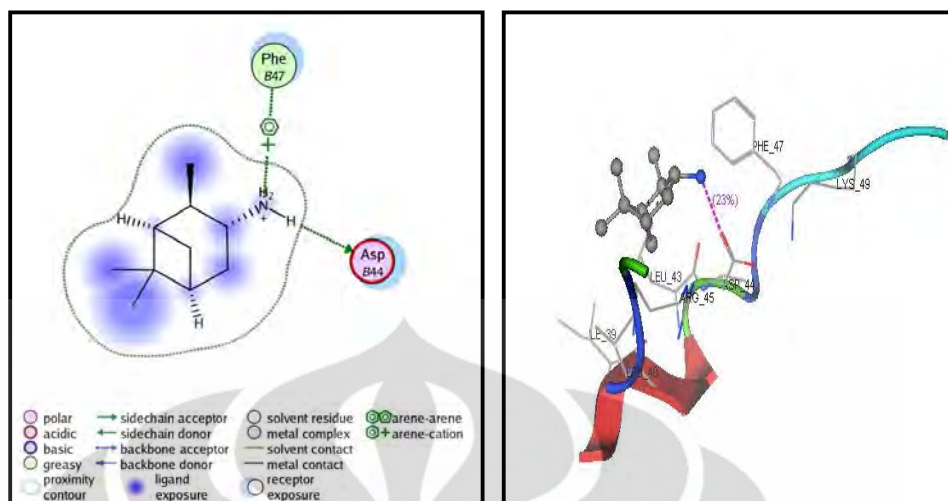
Gambar 4.7 . Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Ligand B20 dengan protein *M2 channel*



Gambar 4.8 . Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Amantadine dengan protein *M2 channel*



Gambar 4.9. Visualisasi Interaksi 2D dan 3D rimantadine dengan protein *M2 channel*



Gambar 4.10 . Visualisasi Interaksi 2D dan 3D Isopinocampheylamine dengan protein M2 *channel*

4.4.6 Analisis *Drug Scan*

Tiga ligan terbaik hasil analisis docking diujii sifat kesamaannya dengan obat yang telah ada (*Drug Likeness*) dengan menggunakan aturan Lipinski. (*Lipinski's Rule of Five*). *Lipinski's Rule of Five* membantu untuk membedakan antara molekul *drug like* dan *non drug like* dengan memperhatikan tingkat absorpsi atau permeabilitas terhadap lipid bilayer yang terdapat di dalam tubuh manusia, aturan tersebut memprediksi dengan probabilitas yang cukup tinggi dalam menentukan *drug likeness* dari suatu molekul yang memiliki 2 (dua) atau lebih kriteria seperti dibawah ini :

1. Berat molekul kurang dari 500 mg/mol
2. Memiliki *lipophilicity* tinggi ($\log P$ kurang dari 5)
3. Donor ikatan hidrogen kurang dari 5
4. Akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10
5. *Molar Refractory* antara 40-130 (optional) (*SCFBIO-IITD*)

Berikut ini adalah hasil dari screening ligan berdasarkan *Drug Likeness* dengan menggunakan online software *Lipinski's Filter* (*SCFBIO-IITD*) :

Tabel 4.9 Hasil *Drug scan* tiga ligan terbaik dan ligan standar

No	Ligan	Molecular weight (Dalton)	H-Bond Donor	H-Bond Acceptor	LogP	Molar Refractivity (optional)
1	*Amantadine	152,261	1	0	1,197	45,67
2	*Rimantadine	180,315	1	0	1,833	54,89
3	*Isopinocampheylamine	170,320	1	0	1,935	54,66
4	Ligan A20	250,366	3	2	1,130	70,40
5	Ligan B18	248,354	3	2	0,396	70,05
6	Ligan B20	261,369	2	3	2,680	74,01

Keterangan : * : Standar ; merah : Tidak Lulus

Dari hasil di atas dapat dilihat berat molekul dari kandidat ligan terbaik kurang dari 500 mg/mol. Hal itu berarti memenuhi kriteria dari Lipinsky's Rule. Nilai dari Hydrogen Bond donor dan acceptor nya pun kurang dari batas maksimal yang diperbolehkan oleh *Lipinsky's Rule*. Nilai logP dari tiga kandidat ligan terbaik maupun ligan standar juga memenuhi aturan dari *Lipinsky's Rule*. Nilai log P merupakan koefisien partisi yang dirumuskan sebagai rasio konsentrasi suatu molekul dalam oktanol dan air. Analisis *drug scan* dilakukan terhadap 2 ligan terbaik hasil analisis *docking*, yang memiliki fungsi *scoring* terendah. Nilai log P ini berhubungan dengan hidrofobisitas molekul obat. Semakin besar nilai log P, semakin hidrofobik molekul tersebut. Molekul obat yang terlalu hidrofobik cenderung memiliki toksisitas yang lebih besar karena akan tertahan lebih lama di *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan terhadap enzim target menjadi berkurang. Nilai log P yang terlalu negatif juga tidak dapat disarankan karena jika senyawa terlalu hidrofilik maka tidak dapat melewati lapisan *lipid bilayer* dan dimungkinkan akan cepat terjadi interaksi dengan pelarut air. Kriteria terakhir yaitu nilai dari molar refractivity. Menurut Lipinsky's Rule nilai molar refractivity yang diperbolehkan yaitu antara 40 sampai 130. Ketiga kandidat ligan tersebut memenuhi aturan

tersebut begitu juga dengan ligan standar. *Molar refractivity* merupakan suatu ukuran nilai total polarisabilitas dari molekul obat yang sangat bergantung pada suhu, indeks bias, dan tekanan. Penentuan nilai *molar refractivity* dapat dilakukan dengan menggunakan perumusan *Lorentz-Lorentz*.

$$MR = \frac{\eta^2 - 1}{\eta^2 + 2} = \frac{M}{\rho}$$

Dimana M adalah bobot molekul, n adalah indeks bias, r adalah kerapatan yang nilainya hanya bergantung gelombang cahaya yang digunakan untuk mengukur indeks bias. Dari analisa *drug scan* menggunakan *Lipinsky's rule of five* dapat disimpulkan bahwa ketiga kandidat ligan terbaik tersebut dimungkinkan untuk dapat menjadi kandidat obat oral.

Selain dengan *Lipinsky's rules of five*, Nilai dari *Drug Likeness* juga dapat dilihat dari tingkat bioavailabilitas oral. Bioavailabilitas oral yang tinggi seringkali menjadi pertimbangan yang penting untuk mengembangkan molekul bioaktif sebagai zat terapi (Veber, *et al*, 2002; Wulandari, Evi Kristin, 2010).

Bioavailabilitas oral adalah sejauh mana suatu obat atau bahan lainnya akan tersedia untuk jaringan target setelah pemberian obat atau bahan tersebut (Wulandari, Evi Kristin, 2010). Screening tingkat oral bioavailability dari suatu ligan dapat dilakukan menggunakan aturan *Egan's rules* (Egan et al. J Med Chem. 2000). Berdasarkan *Egan's Rules* suatu molekul dikatakan memiliki tingkat *oral bioavailability* yang baik apabila memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. $0 \geq \text{tPSA} \leq 132 \text{ \AA}$
2. $-1 \geq \log P \leq 6$

Screening dilakukan dengan terlebih menentukan *ligan properties* dengan menggunakan online software *molinspirations* (molinspirations.com). Berikut adalah hasil dari screening *oral bioavailability* dari standar dan ligan :

Tabel 4.10 Hasil screening *oral bioavailability* standar dan ligan (*Egan's Rules*)

No	Ligan	LogP	tPSA (Å)
1	*Amantadine	1,197	27,640
2	*Rimantadine	1,833	27,640
3	*Isopinocampheylamine	1,935	27,640
4	Ligan A20	1,130	67,570
5	Ligan B18	0,396	65,520
6	Ligan B20	2,680	61,270

Keterangan : * : Standar ; merah : Tidak Lulus

Dari hasil screening *oral bioavailability* standar dan ligan menggunakan *Egan's Rules*, terlihat bahwa tiga kandidat ligan terbaik memenuhi kriteria *Egan's Rules*. Dapat disimpulkan bahwa tiga kandidat ligan terbaik yaitu ligan A20, ligan B18, ligan B20 memiliki tingkat *oral bioavailability* yang baik.

4.11 Prediksi Sifat Toksisitas Inhibitor

Pengujian sifat toksisitas dari tiga kandidat inhibitor protein M2 channel yang didapatkan dari proses sebelumnya menjadi hal yang penting sebagai dasar untuk penentuan obat. Hal tersebut diperlukan untuk memprediksi efek merugikan bagi suatu spesies makhluk hidup. Salah satu metode yang dapat digunakan dalam studi toksikologi ini adalah *Qualitatif or Quantitative Structure-Activity Relationship* atau dapat disebut (Q)SARs. Hasil studi dengan menggunakan hewan yang merupakan dasar dari (Q)SARs dalam studi toksikologi tidak dapat menjamin kelengkapan data yang dibutuhkan untuk studi toksikologi tersebut. Studi dengan menggunakan hewan memiliki beberapa keterbatasan seperti dana dan waktu yang dibutuhkan terlalu besar, ketersediaan laboratorium yang memadai dan mampu untuk melakukan studi tersebut sedikit serta adanya masalah tentang etika dalam penggunaan hewan sebagai bahan uji (*Antonio, et al, 2009*). Untuk membantu mengatasi masalah tersebut telah dikembangkan beberapa alat yang dapat melakukan studi toksikologi atau penentuan sifat toksikologi dari suatu molekul secara cepat dan murah. Beberapa software telah dikembangkan untuk membantu peneliti dalam menentukan *toxicological properties* dari suatu

molekul antara lain : ToxTree (Ideaconult Ltd, Bulgaria) dan Lazar (<http://lazar.in-silico.de/>).

Kedua software diatas akan digunakan dalam menentukan sifat toksikologi dari ketiga ligan hasil screening sebelumnya yaitu ligan A20, ligan B18, dan ligan B20. Penentuan sifat toksikologi dari ketiga ligan tersebut difokuskan pada *carcinogenicity* dan *mutagenicity* karena hal tersebut menjadi perhatian penting dalam kesehatan manusia dan berhubungan langsung dengan tujuan desain ligan yang merupakan desain obat.

Perbedaan dari kedua software tersebut adalah dari dasar penentuan sifat toksikologi dari suatu molekul. Untuk Toxtree didasarkan aturan dari *Benigni/Bossa rulebase* untuk *carcinogenicity* dan *mutagenicity* yang dikembangkan oleh Romualdo Benigni dan Cecilia Bossa dari *Instituto Superiore di Sanita, Rome, Italy* dan disetujui oleh *European Chemical Bureau, Institute for Health and Consumers Protection, European Commision-Joint Research Centre (JRC)* pada tahun 2008. Beberapa hal yang diperhatikan dalam penentuan sifat toksikologi dengan menggunakan *ToxTree* antara lain ada atau tidaknya suatu *structural alerts* (SAs) yang bersifat *genotoxic* maupun *nongenotoxic* dan penentuan secara (Q)SARs. Aturan Benigni dan Bossa ini melihat toksisitasnya berdasarkan keberadaan gugus-gugus yang berpotensi mengandung sifat mutagenik dan karsinogenik dalam senyawa uji tersebut. Berikut ini adalah hasil dari penentuan sifat toksikologi dengan software Toxtree tersebut :

Tabel 4.11 Hasil ToxTree Toxicity Prediction

ToxTree Toxicity Prediction	Ligan A20	Ligan B18	Ligan B20
Structural alert for genotoxic carcinogenicity	No	No	No
Structural alert for nongenotoxic carcinogenicity	No	No	No
Potential carcinogen based on QSAR	No	No	No
Potential S.typhimurium TA100 mutagen based on QSAR	No	No	No
Negative for genotoxic carcinogenicity	Yes	Yes	Yes
Negative for nongenotoxic carcinogenicity	Yes	Yes	Yes

Dari hasil *toxicological prediction* menggunakan *software ToxTree* terlihat ketiga ligan tidak memiliki *structural alerts* (SAs) yang bersifat *genotoxic* maupun *nongenotoxic* dan juga dengan pendekatan (Q)SARs tidak bersifat *mutagen* maupun *carcinogen*.

Sedangkan untuk *software online Lazar*, prediksi menggunakan *software* ini didasari oleh persamaan *structural fragment* dari suatu molekul yang ingin kita ketahui sifat toksikologinya dengan *structural fragment* yang ada pada *databases* yang telah diketahui *carcinogenicity* dan *mutagenicity*-nya dan merupakan hasil uji dengan menggunakan hewan uji dan mikroba. Berikut ini adalah hasil dari penentuan sifat toksikologi dengan *software Lazar* tersebut :

Tabel 4.12 Hasil Lazar Toxicity Prediction

Lazar toxicity Prediction	Predicted Activity (confidence)		
	Ligan A20	Ligan B18	Ligan B20
96 hr LC50	Not available	Not available	Not Available
Mutagenicity - Salmonella typhimurium (CPDB)	Not available	inactive	Inactive
Mutagenicity - Salmonella typhimurium (Kazius/Bursi)	inactive	inactive	Inactive
Rodent carcinogenicity (multiple sex/species/sites)	inactive	inactive	inactive
Rat carcinogenicity (both sexes)	inactive	active	inactive
Mouse carcinogenicity (both sexes)	inactive	inactive	inactive
Hamster carcinogenicity (both sexes)	Inactive	Not available	Inactive
IRIS upper-bound excess lifetime cancer risk	Not available	Not available	Not Available
FDA Maximum Recommended Daily Dose (FDAMDD)	Not available	Not available	Not Available

Hasil *software Lazar* dapat diprediksi sifat *mutagen* dari ketiga ligan pada *Salmonella Typhimurium* dengan dua metode CPDB dan Kazius/Bursi. Dari pengujian tersebut ketiga ligan tersebut menunjukkan hasil negatif. Untuk sifat *carcinogen* yang diprediksi dengan menggunakan hewan uji terhadap hewan pengerat (*rodent*), tikus (*rat*), mencit (*mouse*) dan hamster. Hasil pengujian menggunakan ketiga hewan tersebut menunjukkan sifat karsinogenisitas negatif, hanya ligan B18 yang menunjukkan hasil *active* atau positif bersifat *carcinogen* terhadap rat. Beberapa parameter pada *software Lazar* tidak menunjukkan hasil (not available) terhadap ketiga ligan disebabkan oleh ketersediaan data yang memiliki kesamaan dengan *structural fragment* kurang mendukung sehingga tidak cukup untuk memprediksi hasil dari parameter tersebut seperti LC50 dan *daily dose*.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan 52 buah ligan modifikasi senyawa (1R,2R,3R,5S)-(-)-isopinocampheylamine . Dalam proses *docking* diperoleh tiga ligan terbaik yang memiliki nilai $\Delta G_{\text{binding}}$ paling rendah dan interaksi yang paling baik dengan protein *M2 channel* dibandingkan dengan ligan standar amantadine, rimantadine dan isopinocampheylamine. Ketiga ligan tersebut adalah ligan A20, B18, dan B20. Dari hasil *docking* diperoleh data bahwa ketiga ligan tersebut membentuk ikatan hidrogen dengan residu fungsional *M2 channel*, yaitu Asp44. Analisis *drug scan* memberikan hasil yang baik untuk ketiga ligan terbaik. Hal ini berdasarkan aturan Lipinski. Nilai bobot molekul, nilai $\log P$, *molar refractivity* dari ketiga ligan tersebut memenuhi aturan dari *Lipinski*. Sifat toksikologi dari ligan A20, B18 dan 820 secara keseluruhan diprediksi tidak bersifat *carcinogen* maupun *mutagen*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan *molecular dynamic simulation* untuk mengetahui pengaruh suhu serta pelarut pada interaksi ligan dengan protein *M2 channel* dan juga perlu dilakukan analisis ADME dan *bioactivity* dari ligan yang telah di desain untuk mengetahui perlakuan dari sistem tubuh manusia terhadap ligan yang telah dibuat.

DAFTAR REFERENSI

- Acharya, Rudresh et al. 2010. Structure and Mechanism of Proton Transport through the Transmembrane Tetrameric M2 Protein Bundle of the Influenza A Virus. *PNAS*, 2010, vol. 107, No.34, 15075-15080
- Alberts, Bruce et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.
- Alonso, Hernan., et al. (2006). Combining Docking and Molecular Dynamic Simulation in Drug Design. *Wiley InterScience*, 26, 5, 531-568
- Amri, Noval. 2011. Desain Inhibitor Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 dengan Peptida Siklis. *Depok: Departemen Kimia FMIPA UI*
- Balannik, Victoria et al. 2009. Design and Pharmacological Characterization of Inhibitors of Amantadine –Resistant Mutants of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus. *Biochemistry* 2009, 48, 11872-11882
- Balannik, Victoria et al. 2010. Functional Studies and Modelling of Pore-Lining Residue Mutants of the Influenza A Virus M2 Ion Channel. *Biochemistry* 2010, 49, 696-708
- Baxevanis, Oullette. 2001. *Bioinformatics : A Practical Guide to The Analysis of Genes and Protein*, 2nd edition. Wiley
- Beigel, J. H., et al.. 2005. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.*, 353 (13): 1374-1385
- Benigni, Romualdo, et al. 2008. The Benigni/Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity a module of ToxTree. *JRC scientific and technical reports*.
- Betakova, Tatiana. 2007. M2 Protein – A Proton Channel of Influenza A Virus. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13, 3231-3235.

- Boda, Krisztina. 2007. Structure and reaction based evaluation of synthetic accessibility. *J Comput Aided Mol Des* 21:311–325.
- Claverie, J.M., and Notradame, C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing Corporation: New York
- Cook, I.T., Leyh, T.S., Kadlubar, S.A., Falany, C.N. (2009). Structural rearrangement of SULT2A1: effects on dehydroepiandrosterone and raloxifene sulfation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 1: 81–87
- De Clercq, E. 2006. Antiviral agents active against influenza A virus, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5: 1015-1025.
- Du, Qi-Shi., Ri-Bo Huang., Shu-Qing Wang. 2010. Designing Inhibitors of M2 Protein Channel Against H1N1 Swine Influenza Virus. *Plos one* 5 (2010) 9388
- Egan WJ, et al. 2000. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate statistic. *J. Med Chem.* 43 : 3867-3877
- Eleftheratos, Stelios et al. 2010. Interaction of Aminoadamantane Derivatives with the Influenza A Virus M2 Channel-Docking Using a Pore Blocking Model. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters* 20 (2010) 4182-4187
- Fadilah. (2010). Karya Pascasarjana Kimia: Penapisan Senyawa Bioaktif dari Suku *Zingiberaceae* sebagai Penghambat Neuraminidase Virus Influenza A (H1N1) Melalui Pendekatan *Docking*. Departemen Kimia-FMIPA UI.
- Fechter, P., Mingay, L., Sharps, J., Chambers, A., Fodor, E. & Brownlee, G. G. 2003. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem.*, 278: 20381-20388.
- Feher, M. & Williams, C. I. (2009). Effect of input differences on the results of docking calculations. *J. Chem. Inf. Model.*, 49, 1704-1714.

- Fodor, E. & Brownlee, G. G. 2002. *Influenza virus replication*. In *Influenza*, pp. 1–30. Edited by C. W. Potter. Elsevier Science: Amsterdam.
- Gambaryan, A., Yamnikova, S., Lvov, D., et al. 2005. Receptor Specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology*, 334:276-83
- Gamblin, S. J., Haire, L. F., Russel, R. J., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D. A., Daniels, R. S., Elliot, A., Wiley, D. C., and Skehel, J. J. 2004. *The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin*. *Journal of Science* Vol 303: 1838-1842.
- Gurtler, et al.. 2007. *Virology of Human Influenza*. In: *Influenza Report*. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal.
<http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm>.
- Halgren, T. (1999). MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.*, 20, 720-729.
- Holsinger, L.J., R.A Lamb. 1991. Influenza Virus M2 Integral Membrane Protein Expressed on the Infected Cell Surface. *Virology* 183 (1991)32-43.
- Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., Ortin, J., Garcia-Sastre, A. & Nieto, A. 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J. Virol.*, 77: 6007-6013.
- Intharathep, et al., 2008. How Amantadine and Rimantadine Inhibit Proton Transport in the M2 Protein Channel. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 27 (2008) 342-348.
- Jung, T. E., & Brownlee, G.G. 2006. A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. *General Virology*, 87: 679- 688.
- Kamps-Hoffman-Preiser. 2006. *Influenza Report 2006*. Flying Publisher

- Kataoka, R., Goto, J., Muta, H., and Hirayama, M. (2008). ASEDock-Docking Based on Alpha Spheres and Excluded Volumes. *J. Chem. Inf. Model.* 48:583-590
- Kawaguchi, A., Naito, T. & Nagata, K. 2005. Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* 79, 732-744.
- Lamb, R. A. & Krug, R. M. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, pp. 1487–1579. Edited by P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Laohpongspaisan, Chittima et al. 2009. Why Amantadine Loses Its Function in Influenza M2 Mutants: MD Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* 2009,49, 847-852
- Leach, A. R. 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. New York: McGraw Hill
- Lehninger. 1990. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Jakarta: Erlangga
- Liu, H., Yao, X. 2009. Molecular basis of the interaction for an essential subunit PA-PB1 in influenza virus RNA polymerase : insights from molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Molecular pharmaceutics*
- Maasab, H. F., Cochran, K., Tsunoda, A., and Berlin, B. S. *Studies on the Antiviral Activity of Amantadine Hydrochloride*. 1999. New York Academic Science; 130: pp 432-439
- Manavalan, B., Murugapiran S.K., Gwang Lee, Sangdun Choi. (2010). Molecular modeling of the reductase domain to elucidate the reaction mechanism of reduction of peptidyl thioester into its corresponding alcohol in non-ribosomal peptide synthetases. *BMC Structural Biology* 10:1472-6807

- Moscona, A. 2005. Drug Therapy Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *The New England Journal of Medicine*, 353: 1363-1673
- MOE tutorial.(2008). Quebec. Canada
- Nindyapati, Bramantya. 2010. Modifikasi *Suberoylanilide Hydroxamic Acid* (SAHA) sebagai Inhibitor Potensial *Histone Deacetylase* (HDAC) Kelas II secara *In silico*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI
- Noviardi, Harry. 2010. Karya Pascasarjana Kimia:Perancangan Peptida Siklis Disulfida melalui Simulasi Molecular Docking dan Dynamics sebagai Inhibitor Potensial dari Interaksi Enzim PA_C-PB_{1N} Polymerase Virus H1N1. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI
- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. 2004. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 283, 121–143.
- Nurbaiti, Santi.(2009). Stabilitas termal dan pergerakan dinamis klenow-like DNA polimerase I ITB-1 berdasarkan simulasi dinamika molekul. Disertasi Program Studi Kimia-Institut Teknologi Bandung
- Rahdiansyah,Mochamad Reza.2010. Karya Pascasarjana Kimia: Perancangan Inhibitor M2 Proton Channel Virus Influenza A Subtipe H1N1 Melalui *Docking* dan Simulasi Dinamika Molekul. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI
- Rungrotmongkol, T., P. Intharathep, M. Malaisree, N. Nunthaboot, N. Kaiyawet, P. Sompornpisut, S. Payungporn, Y. Poovorawan and S. Hannongbua. 2009. Susceptibility of antiviral drugs against 2009. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 30 (2009) 342-348.

- Sakaguchi, Q., L.H. Pinto., R.A. Laamb. The Active Oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 5000-5005
- Samira. (2009). *Perancangan Peptida Siklis sebagai Inhibitor Potensial untuk Enzim NS3-NS2B Protease Virus Dengue secara In Silico melalui Molecular Docking*. Skripsi. Depok: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Singh, H., Marla, S. S. & M. Agarwal. (2007). Docking studies of tau protein. *IJCS*, 33,1-7.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T. M., Taubenberger, J. K., Palson, J. C., & Wilson, I. A. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science.*, 312: 404-410.
- Teodoro, M. L., Phillips, G. N., Kavraki, L. E. 2001. Molecular docking: a problem with thousands of degrees of freedom. <http://phillipslab.biochem.wisc.edu/pdfs/108docking.pdf>.
- Toxic User Manual*. 2008. Experimental and Computational Carcinogenesis Unit Environment and Health Department Istituto Superiore di Sanita' Viale Regina Elena 299 00161 Rome Italy
- Utama. 2003. *Aplikasi Bioinformatika dalam Virologi*.
- Veber, *et al.* 2002. Molecular Properties that Influence the oral Bioavailability of drug Candidates . *J. Med. Chem.* 47 (1) 224-232.
- Wang, Jin-Fang., Dong-Qing Wei., Kuo-Chen Chou. 2009. Insight from Investigating the Interactions of Adamantane-based Drugs with the M2 Proton Channel from the H1N1 Swine Virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388 (2009) 413-417
- Webby RJ, Webster RG. Emergence of influenza A viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 1817-28

Wulandari, Evi Kristin. 2010. Karya Pascasarjana Kimia : Analisis Interaksi Histone Deacetylase (HDAC) Kelas II Homo Sapiens Dengan Suberoyllanilide Hydroxamic Acids (SAHA) dan Trichostantin A (TSA). *Depok: Departemen Kimia FMIPA UI*.

Zeng et al.2010.Identification of Hits as Matrix-2 Protein Inhibitors through the Focused Screening of a Small Primary Amine Library. *J. Med. Chem.* (2010) 53, 3831-3834.

Zhao, Xin., Chufang Li., Wenhui Hu.2011.Discovery of Highly Potent Agents Againts Influenza A Virus.*European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011)52-57

<http://emedicinemedscape.com> diakses Januari 2011

<http://www.FluTrackers.com> diakses Januari 2011

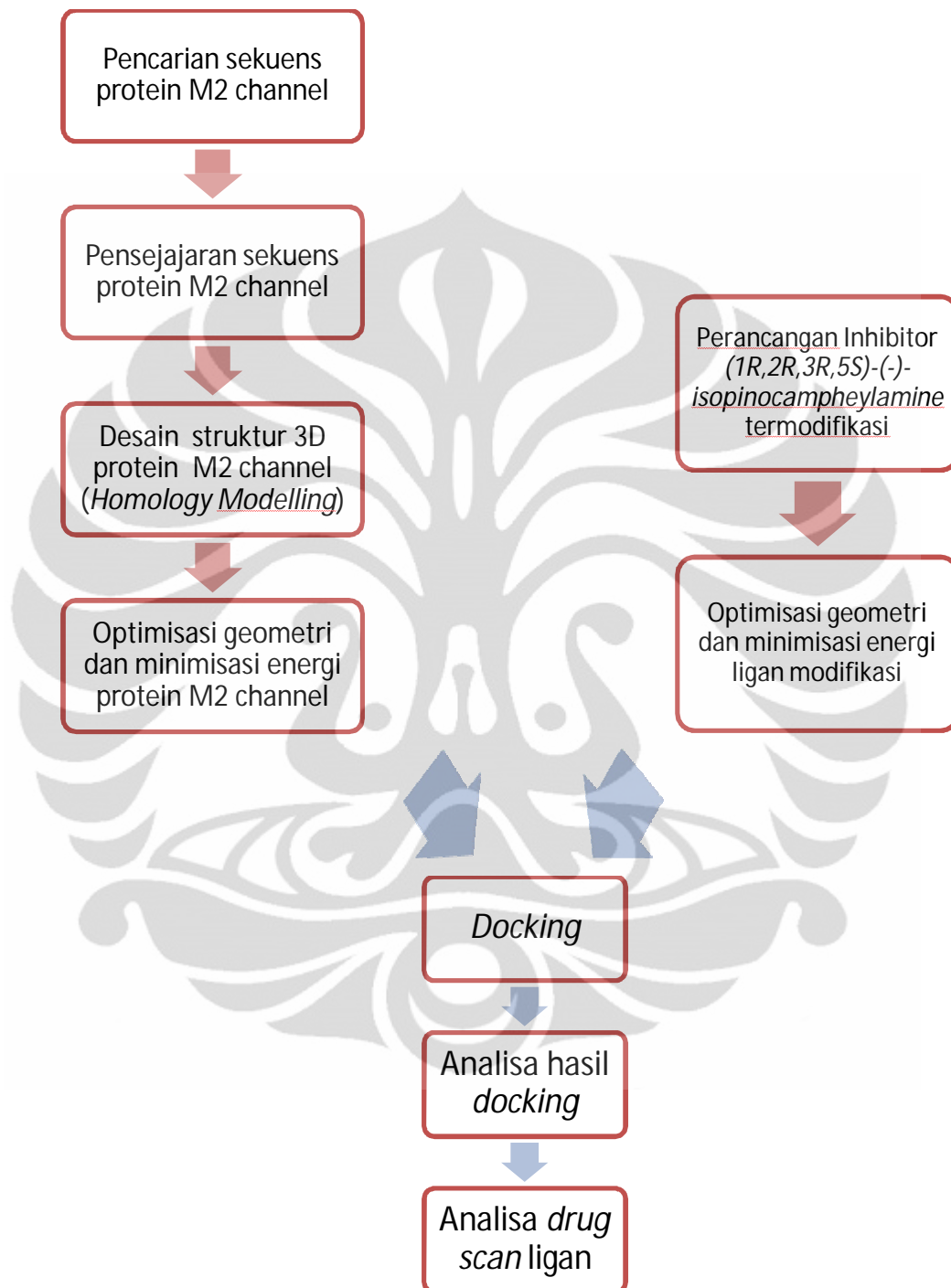
<http://www.ifpma.org/index.php?id=4175> diakses Januari 2011

<http://www.litbang.depkes.go.id/>

<http://sciencebiotech.net/mengenal-virus-influenza/> diakses Januari 2011

<http://www.scientificpsychic.com/health/virus.html> diakses Januari 2011

<http://www.temple.edu/cst/icms/biomedical.html> diakses januari 2011

Lampiran 1. Bagan kerja penelitian

Lampiran 2. Parameter dan hasil pencarian sekuens protein M2 channel

Select sequence type:
 Protein Protein coding region Nucleotide

Search for keyword:
 Keyword: Search in:

Define search set:

Type	Host	Country/Region	Protein	Subtype
any	Ferret	any	M1	H any
A	Giant anteater	regions	M2	N any
B	Human	Africa	NS1	1
C	Leopard	Asia	NS2	2
				3

Sequences length
 Min.: Max.:
 From: 2009 To: 2010
 Year Month Day Year Month Day

Full-length only

Additional filters: [show](#)

Influenza Virus Resource
 Information, Search and Analysis

HOME SEARCH SITE MAP Flu home Database Genome Set Alignment Tree BLAST Annotation FTP Help Contact us

Influenza Virus Sequence Database

Query [show](#) [Permanent link for this query](#)

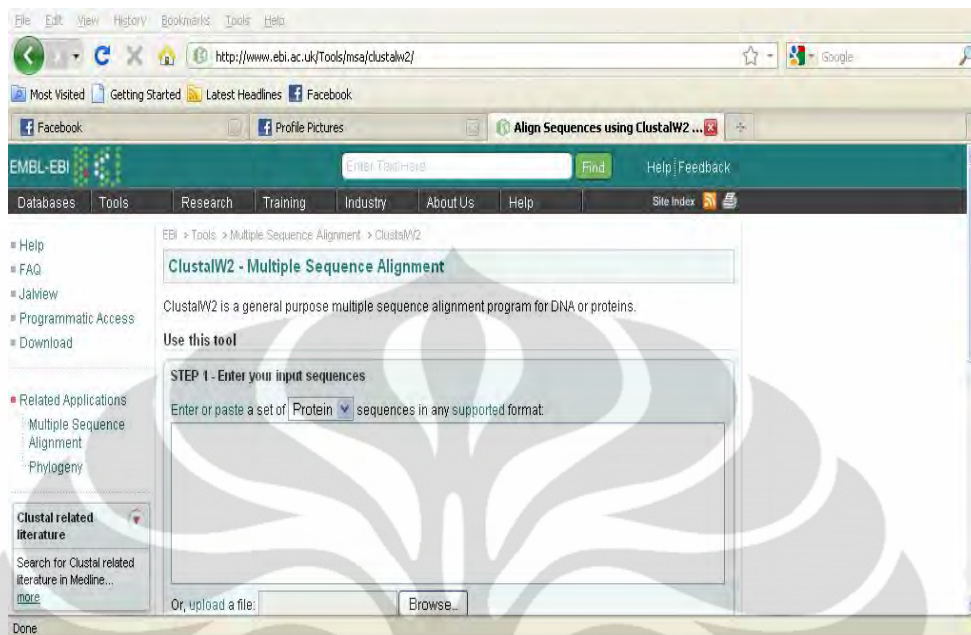
Note: All groups of identical sequences in the dataset will be represented by the oldest sequence in the group. Metadata of the collapsed sequences are not preserved.

Protein (FASTA) [Customize FASTA define](#)

173 protein sequences after collapsing (3189 total)

<input checked="" type="checkbox"/>	Accession	Length	Host	Protein	Subtype	Country	Date	Virus name	Mutations	Age	Gender	#
<input checked="" type="checkbox"/>	ADH01960	97	Human	M2	H1N1	Denmark	2009/12/02	Influenza A virus (A/Aalborg/INS133/2009(H1N1))	S31N			30
<input checked="" type="checkbox"/>	ADMI4976	97	Human	M2	H1N1	Ethiopia	2009/12/01	Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADMI4471	97	Human	M2	H1N1	Jordan	2009/10/15	Influenza A virus (A/Amman/WR0060N/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADMI4704	97	Human	M2	H1N1	Jordan	2009/11/19	Influenza A virus (A/Amman/WR1335T/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADMI4713	97	Human	M2	H1N1	Turkey	2009/10/19	Influenza A virus (A/Ankara/WR1429T/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADA83584	96	Human	M2	H1N1	Argentina	2009/06/05	Influenza A virus (A/Argentina/HNRG13/2009(H1N1))	S31N	5 M		
<input checked="" type="checkbox"/>	ADMI4520	97	Human	M2	H1N1	Turkmenistan	2009/10/28	Influenza A virus (A/Ashgabat/WR0865N/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADH02000	97	Human	M2	H1N1	Greece	2009/12/29	Influenza A virus (A/Athens/INS153/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADG42365	97	Human	M2	H1N1	Greece	2009/12/18	Influenza A virus (A/Athens/INS159/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADG42405	97	Human	M2	H1N1	Greece	2009/12/20	Influenza A virus (A/Athens/INS163/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADG42425	97	Human	M2	H1N1	Greece	2009/12/21	Influenza A virus (A/Athens/INS165/2009(H1N1))	S31N			
<input checked="" type="checkbox"/>	ADD21896	97	Human	M2	H1N1	Australia	2009/07/20	Influenza A virus (A/Australia)	S31N			

Lampiran 3. *Multiple sequence alignment* dengan ClustalW2



Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment*

seqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	ADH01960	97	2	ADM14979	97	97.0
1	ADH01960	97	3	ADM14471	97	97.0
1	ADH01960	97	4	ADM14704	97	97.0
1	ADH01960	97	5	ADM14713	97	97.0
1	ADH01960	97	6	ADA83584	96	96.0
1	ADH01960	97	7	ADM14520	97	97.0
1	ADH01960	97	8	ADH02000	97	97.0
1	ADH01960	97	9	ADG42365	97	97.0
1	ADH01960	97	10	ADG42405	97	97.0
1	ADH01960	97	11	ADG42425	97	97.0
1	ADH01960	97	12	ADD21896	97	97.0
1	ADH01960	97	13	ADD22677	97	97.0
1	ADH01960	97	14	ADD22784	97	97.0
1	ADH01960	97	15	ADM14961	97	97.0
1	ADH01960	97	16	ACR10228	97	97.0
1	ADH01960	97	17	ACV42022	97	97.0
1	ADH01960	97	18	ADC38999	97	97.0
1	ADH01960	97	19	ADM14529	97	97.0
1	ADH01960	97	20	ADM14539	97	97.0
1	ADH01960	97	21	ADI48634	97	97.0
1	ADH01960	97	22	ADI49364	97	97.0
1	ADH01960	97	23	ADO30409	97	97.0
1	ADH01960	97	24	ADW10767	97	80.0
1	ADH01960	97	25	ADW10789	97	79.0
1	ADH01960	97	26	ADW10833	97	79.0
1	ADH01960	97	27	ADI48624	97	97.0
1	ADH01960	97	28	ACT36629	97	97.0
1	ADH01960	97	29	ADJ80736	97	97.0
1	ADH01960	97	30	ADJ80786	97	97.0
1	ADH01960	97	31	ADD21796	97	97.0
1	ADH01960	97	32	ADN89074	97	79.0
1	ADH01960	97	33	ADN89096	97	79.0
1	ADH01960	97	34	ADN89481	97	79.0
1	ADH01960	97	35	ADN89569	97	79.0
1	ADH01960	97	36	ADN89712	97	79.0
1	ADH01960	97	37	ADN89734	97	79.0
1	ADH01960	97	38	ADN89745	97	79.0
1	ADH01960	97	39	ADJ81025	97	97.0
1	ADH01960	97	40	ADB89613	97	98.0
1	ADH01960	97	41	ADM14566	97	97.0
1	ADH01960	97	42	ADM14575	97	97.0
1	ADH01960	97	43	ADM14584	97	97.0
1	ADH01960	97	44	ADM14593	97	97.0
1	ADH01960	97	45	ADM14603	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

1	ADH01960	97	46	ADM14622	97	97.0
1	ADH01960	97	47	ADM14631	97	97.0
1	ADH01960	97	48	ADM14641	97	97.0
1	ADH01960	97	49	ADM14650	97	97.0
1	ADH01960	97	50	ADM14659	97	97.0
1	ADH01960	97	51	ADN24160	97	97.0
1	ADH01960	97	52	ACU31154	97	97.0
1	ADH01960	97	53	ACY77677	97	97.0
1	ADH01960	97	54	ADD23262	97	97.0
1	ADH01960	97	55	ACS72579	97	97.0
1	ADH01960	97	56	ADM14722	97	97.0
1	ADH01960	97	57	ADM14741	97	97.0
1	ADH01960	97	58	ADJ95211	97	96.0
1	ADH01960	97	59	ADM12893	97	97.0
1	ADH01960	97	60	ADM14481	97	97.0
1	ADH01960	97	61	ACT21581	96	98.0
1	ADH01960	97	62	ACU44087	97	79.0
1	ADH01960	97	63	ACU44016	97	81.0
1	ADH01960	97	64	ACU44073	97	81.0
1	ADH01960	97	65	ADM95491	97	97.0
1	ADH01960	97	66	ADB82952	97	97.0
1	ADH01960	97	67	ADK90335	97	96.0
1	ADH01960	97	68	ADL32416	97	97.0
1	ADH01960	97	69	ADM32843	97	97.0
1	ADH01960	97	70	ADM32000	97	97.0
1	ADH01960	97	71	ADE28782	97	97.0
1	ADH01960	97	72	ADE28832	97	97.0
1	ADH01960	97	73	ADM32563	97	97.0
1	ADH01960	97	74	ADM52495	97	97.0
1	ADH01960	97	75	ACZ16042	97	97.0
1	ADH01960	97	76	ACY78006	97	97.0
1	ADH01960	97	77	ADM14557	97	96.0
1	ADH01960	97	78	ADM14861	97	97.0
1	ADH01960	97	79	ADM14870	97	97.0
1	ADH01960	97	80	ADM14880	97	97.0
1	ADH01960	97	81	ADM14898	97	96.0
1	ADH01960	97	82	ADM14907	97	97.0
1	ADH01960	97	83	ADM14916	97	97.0
1	ADH01960	97	84	ADM14925	97	97.0
1	ADH01960	97	85	ADG27960	97	97.0
1	ADH01960	97	86	ACQ99598	97	97.0
1	ADH01960	97	87	ACR09359	97	97.0
1	ADH01960	97	88	ADT64490	97	98.0
1	ADH01960	97	89	ACY39854	97	97.0
1	ADH01960	97	90	ACU44199	97	80.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

1	ADH01960	97	92	ADM14943	97	97.0
1	ADH01960	97	93	ACZ01957	97	97.0
1	ADH01960	97	94	ADL39460	97	79.0
1	ADH01960	97	95	ACU44063	97	81.0
1	ADH01960	97	96	ACR18961	97	97.0
1	ADH01960	97	97	ACU13056	97	97.0
1	ADH01960	97	98	ACR67216	97	97.0
1	ADH01960	97	99	ACZ05592	97	78.0
1	ADH01960	97	100	ACS78038	97	97.0
1	ADH01960	97	101	ACZ17132	97	97.0
1	ADH01960	97	102	ADD96858	97	97.0
1	ADH01960	97	103	ADD96888	97	97.0
1	ADH01960	97	104	ADD74630	97	97.0
1	ADH01960	97	105	ACU44098	97	80.0
1	ADH01960	97	106	ADD74910	97	97.0
1	ADH01960	97	107	ADC45762	97	79.0
1	ADH01960	97	108	ACU44055	97	82.0
1	ADH01960	97	109	ACU44127	97	81.0
1	ADH01960	97	110	ACZ56084	97	97.0
1	ADH01960	97	111	ACU44004	97	79.0
1	ADH01960	97	112	ADF10254	97	96.0
1	ADH01960	97	113	ADF10363	97	97.0
1	ADH01960	97	114	ADF10839	97	97.0
1	ADH01960	97	115	ACR18963	97	97.0
1	ADH01960	97	116	ADD23417	97	97.0
1	ADH01960	97	117	ADM14952	97	97.0
1	ADH01960	97	118	ADB81423	97	97.0
1	ADH01960	97	119	ADA79611	97	97.0
1	ADH01960	97	120	ADA79591	97	97.0
1	ADH01960	97	121	ADK32492	97	97.0
1	ADH01960	97	122	ADG42105	97	96.0
1	ADH01960	97	123	ADM33274	97	97.0
1	ADH01960	97	124	ADM33369	97	97.0
1	ADH01960	97	125	ADM32943	97	97.0
1	ADH01960	97	126	ADM14548	97	97.0
1	ADH01960	97	127	ACU27411	97	87.0
1	ADH01960	97	128	ACV33302	97	80.0
1	ADH01960	97	129	ADQ43776	97	96.0
1	ADH01960	97	130	ACY46487	96	97.0
1	ADH01960	97	131	ACY46497	96	97.0
1	ADH01960	97	132	ADM14677	97	97.0
1	ADH01960	97	133	ADM14686	97	97.0
1	ADH01960	97	134	ADM14695	97	97.0
1	ADH01960	97	135	ACT21967	97	97.0
1	ADH01960	97	136	ADM14750	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

1	ADH01960	97	137	ADM14760	97	97.0
1	ADH01960	97	138	ADM14769	97	97.0
1	ADH01960	97	139	ACU44173	97	79.0
1	ADH01960	97	140	ADM13023	97	97.0
1	ADH01960	97	141	ACQ76375	97	97.0
1	ADH01960	97	142	ACU44139	97	80.0
1	ADH01960	97	143	ACZ95859	97	97.0
1	ADH01960	97	144	ACZ96478	97	97.0
1	ADH01960	97	145	ACZ96581	97	97.0
1	ADH01960	97	146	ACZ17500	97	97.0
1	ADH01960	97	147	ACZ96049	97	97.0
1	ADH01960	97	148	ACZ95919	97	97.0
1	ADH01960	97	149	ACZ95979	97	97.0
1	ADH01960	97	150	ACZ96091	97	97.0
1	ADH01960	97	151	ADF42691	97	97.0
1	ADH01960	97	152	ADF42701	97	96.0
1	ADH01960	97	153	ACZ81531	97	79.0
1	ADH01960	97	154	ACV82215	97	81.0
1	ADH01960	97	155	ACZ81535	97	81.0
1	ADH01960	97	156	ADV17307	97	97.0
1	ADH01960	97	157	ACV53444	97	97.0
1	ADH01960	97	158	ADM86452	97	97.0
1	ADH01960	97	159	ACU44097	97	79.0
1	ADH01960	97	160	ACU44045	97	81.0
1	ADH01960	97	161	ACU44051	97	79.0
1	ADH01960	97	162	ACU44018	97	81.0
1	ADH01960	97	163	ACZ16392	97	97.0
1	ADH01960	97	164	ADD98020	97	97.0
1	ADH01960	97	165	ADG42905	97	95.0
1	ADH01960	97	166	ADD75160	97	96.0
1	ADH01960	97	167	ACV70716	97	97.0
1	ADH01960	97	168	ACZ16152	97	97.0
1	ADH01960	97	169	ADG42875	97	97.0
1	ADH01960	97	170	ACZ16822	97	97.0
1	ADH01960	97	171	ACY39876	97	97.0
1	ADH01960	97	172	ADG08122	97	96.0
1	ADH01960	97	173	ADG96392	97	97.0
2	ADM14979	97	3	ADM14471	97	100.0
2	ADM14979	97	4	ADM14704	97	100.0
2	ADM14979	97	5	ADM14713	97	100.0
2	ADM14979	97	6	ADA83584	96	97.0
2	ADM14979	97	7	ADM14520	97	100.0
2	ADM14979	97	8	ADH02000	97	97.0
2	ADM14979	97	9	ADG42365	97	97.0
2	ADM14979	97	10	ADG42405	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

2	ADM14979	97	11	ADG42425	97	97.0
2	ADM14979	97	12	ADD21896	97	97.0
2	ADM14979	97	13	ADD22677	97	97.0
2	ADM14979	97	14	ADD22784	97	97.0
2	ADM14979	97	15	ADM14961	97	100.0
2	ADM14979	97	16	ACR10228	97	97.0
2	ADM14979	97	17	ACV42022	97	97.0
2	ADM14979	97	18	ADC38999	97	97.0
2	ADM14979	97	19	ADM14529	97	100.0
2	ADM14979	97	20	ADM14539	97	100.0
2	ADM14979	97	21	ADI48634	97	97.0
2	ADM14979	97	22	ADI49364	97	97.0
2	ADM14979	97	23	ADO30409	97	97.0
2	ADM14979	97	24	ADW10767	97	80.0
2	ADM14979	97	25	ADW10789	97	79.0
2	ADM14979	97	26	ADW10833	97	79.0
2	ADM14979	97	27	ADI48624	97	97.0
2	ADM14979	97	28	ACT36629	97	97.0
2	ADM14979	97	29	ADJ80736	97	97.0
2	ADM14979	97	30	ADJ80786	97	97.0
2	ADM14979	97	31	ADD21796	97	97.0
2	ADM14979	97	32	ADN89074	97	79.0
2	ADM14979	97	33	ADN89096	97	79.0
2	ADM14979	97	34	ADN89481	97	79.0
2	ADM14979	97	35	ADN89569	97	79.0
2	ADM14979	97	36	ADN89712	97	79.0
2	ADM14979	97	37	ADN89734	97	79.0
2	ADM14979	97	38	ADN89745	97	79.0
2	ADM14979	97	39	ADJ81025	97	97.0
2	ADM14979	97	40	ADB89613	97	97.0
2	ADM14979	97	41	ADM14566	97	100.0
2	ADM14979	97	42	ADM14575	97	100.0
2	ADM14979	97	43	ADM14584	97	100.0
2	ADM14979	97	44	ADM14593	97	100.0
2	ADM14979	97	45	ADM14603	97	100.0
2	ADM14979	97	46	ADM14622	97	100.0
2	ADM14979	97	47	ADM14631	97	100.0
2	ADM14979	97	48	ADM14641	97	100.0
2	ADM14979	97	49	ADM14650	97	100.0
2	ADM14979	97	50	ADM14659	97	100.0
2	ADM14979	97	51	ADN24160	97	97.0
2	ADM14979	97	52	ACU31154	97	97.0
2	ADM14979	97	53	ACY77677	97	97.0
2	ADM14979	97	54	ADD23262	97	97.0
2	ADM14979	97	55	ACS72579	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

2	ADM14979	97	56	ADM14722	97	100.0
2	ADM14979	97	57	ADM14741	97	100.0
2	ADM14979	97	58	ADJ95211	97	96.0
2	ADM14979	97	59	ADM12893	97	97.0
2	ADM14979	97	60	ADM14481	97	100.0
2	ADM14979	97	61	ACT21581	96	98.0
2	ADM14979	97	62	ACU44087	97	79.0
2	ADM14979	97	63	ACU44016	97	80.0
2	ADM14979	97	64	ACU44073	97	80.0
2	ADM14979	97	65	ADM95491	97	97.0
2	ADM14979	97	66	ADB82952	97	97.0
2	ADM14979	97	67	ADK90335	97	96.0
2	ADM14979	97	68	ADL32416	97	97.0
2	ADM14979	97	69	ADM32843	97	97.0
2	ADM14979	97	70	ADM32000	97	97.0
2	ADM14979	97	71	ADE28782	97	97.0
2	ADM14979	97	72	ADE28832	97	97.0
2	ADM14979	97	73	ADM32563	97	97.0
2	ADM14979	97	74	ADM52495	97	97.0
2	ADM14979	97	75	ACZ16042	97	97.0
2	ADM14979	97	76	ACY78006	97	97.0
2	ADM14979	97	77	ADM14557	97	98.0
2	ADM14979	97	78	ADM14861	97	100.0
2	ADM14979	97	79	ADM14870	97	100.0
2	ADM14979	97	80	ADM14880	97	100.0
2	ADM14979	97	81	ADM14898	97	98.0
2	ADM14979	97	82	ADM14907	97	100.0
2	ADM14979	97	83	ADM14916	97	100.0
2	ADM14979	97	84	ADM14925	97	100.0
2	ADM14979	97	85	ADG27960	97	97.0
2	ADM14979	97	86	ACQ99598	97	97.0
2	ADM14979	97	87	ACR09359	97	97.0
2	ADM14979	97	88	ADT64490	97	98.0
2	ADM14979	97	89	ACY39854	97	97.0
2	ADM14979	97	90	ACU44199	97	80.0
2	ADM14979	97	91	ADM14788	97	100.0
2	ADM14979	97	92	ADM14943	97	100.0
2	ADM14979	97	93	ACZ01957	97	97.0
2	ADM14979	97	94	ADL39460	97	79.0
2	ADM14979	97	95	ACU44063	97	81.0
2	ADM14979	97	96	ACR18961	97	97.0
2	ADM14979	97	97	ACU13056	97	97.0
2	ADM14979	97	98	ACR67216	97	97.0
2	ADM14979	97	99	ACZ05592	97	78.0
2	ADM14979	97	100	ACS78038	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

2	ADM14979	97	101	ACZ17132	97	97.0
2	ADM14979	97	102	ADD96858	97	97.0
2	ADM14979	97	103	ADD96888	97	97.0
2	ADM14979	97	104	ADD74630	97	97.0
2	ADM14979	97	105	ACU44098	97	80.0
2	ADM14979	97	106	ADD74910	97	97.0
2	ADM14979	97	107	ADC45762	97	79.0
2	ADM14979	97	108	ACU44055	97	82.0
2	ADM14979	97	109	ACU44127	97	81.0
2	ADM14979	97	110	ACZ56084	97	97.0
2	ADM14979	97	111	ACU44004	97	79.0
2	ADM14979	97	112	ADF10254	97	96.0
2	ADM14979	97	113	ADF10363	97	97.0
2	ADM14979	97	114	ADF10839	97	97.0
2	ADM14979	97	115	ACR18963	97	97.0
2	ADM14979	97	116	ADD23417	97	97.0
2	ADM14979	97	117	ADM14952	97	100.0
2	ADM14979	97	118	ADB81423	97	97.0
2	ADM14979	97	119	ADA79611	97	97.0
2	ADM14979	97	120	ADA79591	97	97.0
2	ADM14979	97	121	ADK32492	97	97.0
2	ADM14979	97	122	ADG42105	97	96.0
2	ADM14979	97	123	ADM33274	97	97.0
2	ADM14979	97	124	ADM33369	97	97.0
2	ADM14979	97	125	ADM32943	97	97.0
2	ADM14979	97	126	ADM14548	97	100.0
2	ADM14979	97	127	ACU27411	97	85.0
2	ADM14979	97	128	ACV33302	97	80.0
2	ADM14979	97	129	ADQ43776	97	96.0
2	ADM14979	97	130	ACY46487	96	97.0
2	ADM14979	97	131	ACY46497	96	97.0
2	ADM14979	97	132	ADM14677	97	100.0
2	ADM14979	97	133	ADM14686	97	100.0
2	ADM14979	97	134	ADM14695	97	100.0
2	ADM14979	97	135	ACT21967	97	97.0
2	ADM14979	97	136	ADM14750	97	100.0
2	ADM14979	97	137	ADM14760	97	100.0
2	ADM14979	97	138	ADM14769	97	100.0
2	ADM14979	97	139	ACU44173	97	79.0
2	ADM14979	97	140	ADM13023	97	97.0
2	ADM14979	97	141	ACQ76375	97	97.0
2	ADM14979	97	142	ACU44139	97	79.0
2	ADM14979	97	143	ACZ95859	97	97.0
2	ADM14979	97	144	ACZ96478	97	97.0
2	ADM14979	97	145	ACZ96581	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

2	ADM14979	97	146	ACZ17500	97	97.0
2	ADM14979	97	147	ACZ96049	97	97.0
2	ADM14979	97	148	ACZ95919	97	97.0
2	ADM14979	97	149	ACZ95979	97	97.0
2	ADM14979	97	150	ACZ96091	97	97.0
2	ADM14979	97	151	ADF42691	97	97.0
2	ADM14979	97	152	ADF42701	97	96.0
2	ADM14979	97	153	ACZ81531	97	79.0
2	ADM14979	97	154	ACV82215	97	81.0
2	ADM14979	97	155	ACZ81535	97	81.0
2	ADM14979	97	156	ADV17307	97	97.0
2	ADM14979	97	157	ACV53444	97	97.0
2	ADM14979	97	158	ADM86452	97	96.0
2	ADM14979	97	159	ACU44097	97	79.0
2	ADM14979	97	160	ACU44045	97	81.0
2	ADM14979	97	161	ACU44051	97	79.0
2	ADM14979	97	162	ACU44018	97	81.0
2	ADM14979	97	165	ADG42905	97	95.0
2	ADM14979	97	166	ADD75160	97	96.0
2	ADM14979	97	167	ACV70716	97	97.0
2	ADM14979	97	168	ACZ16152	97	97.0
2	ADM14979	97	169	ADG42875	97	97.0
2	ADM14979	97	170	ACZ16822	97	97.0
2	ADM14979	97	171	ACY39876	97	97.0
2	ADM14979	97	172	ADG08122	97	96.0
2	ADM14979	97	173	ADG96392	97	97.0
3	ADM14471	97	4	ADM14704	97	100.0
3	ADM14471	97	5	ADM14713	97	100.0
3	ADM14471	97	6	ADA83584	96	97.0
3	ADM14471	97	7	ADM14520	97	100.0
3	ADM14471	97	8	ADH02000	97	97.0
3	ADM14471	97	9	ADG42365	97	97.0
3	ADM14471	97	10	ADG42405	97	97.0
3	ADM14471	97	11	ADG42425	97	97.0
3	ADM14471	97	12	ADD21896	97	97.0
3	ADM14471	97	13	ADD22677	97	97.0
3	ADM14471	97	14	ADD22784	97	97.0
3	ADM14471	97	15	ADM14961	97	100.0
3	ADM14471	97	16	ACR10228	97	97.0
3	ADM14471	97	17	ACV42022	97	97.0
3	ADM14471	97	18	ADC38999	97	97.0
3	ADM14471	97	19	ADM14529	97	100.0
3	ADM14471	97	20	ADM14539	97	100.0
3	ADM14471	97	21	ADI48634	97	97.0
3	ADM14471	97	22	ADI49364	97	97.0

Lampiran 4. Hasil *multiple sequence alignment* (lanjutan)

3	ADM14471	97	23	ADO30409	97	97.0
3	ADM14471	97	24	ADW10767	97	80.0
3	ADM14471	97	25	ADW10789	97	79.0
3	ADM14471	97	26	ADW10833	97	79.0
3	ADM14471	97	27	ADI48624	97	97.0
3	ADM14471	97	28	ACT36629	97	97.0
3	ADM14471	97	29	ADJ80736	97	97.0
3	ADM14471	97	30	ADJ80786	97	97.0
3	ADM14471	97	31	ADD21796	97	97.0
3	ADM14471	97	32	ADN89074	97	79.0
3	ADM14471	97	33	ADN89096	97	79.0
3	ADM14471	97	34	ADN89481	97	79.0
3	ADM14471	97	35	ADN89569	97	79.0
3	ADM14471	97	36	ADN89712	97	79.0
3	ADM14471	97	37	ADN89734	97	79.0
3	ADM14471	97	38	ADN89745	97	79.0
3	ADM14471	97	39	ADJ81025	97	97.0
3	ADM14471	97	40	ADB89613	97	97.0
3	ADM14471	97	41	ADM14566	97	100.0
3	ADM14471	97	42	ADM14575	97	100.0
3	ADM14471	97	43	ADM14584	97	100.0
3	ADM14471	97	44	ADM14593	97	100.0
3	ADM14471	97	45	ADM14603	97	100.0
3	ADM14471	97	46	ADM14622	97	100.0
3	ADM14471	97	47	ADM14631	97	100.0
3	ADM14471	97	48	ADM14641	97	100.0
3	ADM14471	97	49	ADM14650	97	100.0
3	ADM14471	97	50	ADM14659	97	100.0
3	ADM14471	97	51	ADN24160	97	97.0
3	ADM14471	97	52	ACU31154	97	97.0
3	ADM14471	97	53	ACY77677	97	97.0
3	ADM14471	97	54	ADD23262	97	97.0
3	ADM14471	97	55	ACS72579	97	97.0
3	ADM14471	97	56	ADM14722	97	100.0
3	ADM14471	97	57	ADM14741	97	100.0

Lampiran 5. Format *Genpept* dan FASTA dari sekuen protein M2 *Channel* terpilih

The image displays two screenshots of the NCBI Protein database interface, showing the format of the protein sequence in GenPept and FASTA formats.

Top Screenshot (GenPept format):

NCBI Protein
Translations of Life

Search: Protein Limits Advanced search Help

Display Settings: GenPept

matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))]

GenBank: ADM14979.1
FASTA Graphics

Go to:

LOCUS ADM14979 97 aa linear VRL 18-AUG-2010
DEFINITION matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))].
ACCESSION ADM14979
VERSION ADM14979.1 GI:303385772
DBSOURCE accession CTO71829.1
KEYWORDS .
SOURCE Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))
ORGANISM Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))
Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae; Influenzavirus A.
REFERENCE 1 (residues 1 to 97)
AUTHORS Houng,H.-S., Zhou,Y., Lysons,A. and Kuschner,R.A.
TITLE High-throughput genome sequencing of 2009 pandemic H1N1 isolates of worldwide origins using Roche 454 FLX system
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (residues 1 to 97)
AUTHORS Houng,H.-S., Zhou,Y., Lysons,A. and Kuschner,R.A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-AUG-2010) Viral Diseases, Walter Reed Army Institute of Research, 503 Robert Grant Ave., Silver Spring, Maryland 20910, USA
COMMENT Method: conceptual translation.
FEATURES
source
Location/Qualifiers
1..97
/organism="Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))"
/strain="A/Addis Ababa/WR2848T/2009"
/serotype="H1N1"

Bottom Screenshot (FASTA format):

NCBI Protein
Translations of Life

Search: Protein Limits Advanced search Help

Display Settings: FASTA

matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1))]

GenBank: ADM14979.1
GenPept Graphics

```
>gi|303385772|gb|ADM14979.1| matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Addis Ababa/WR2848T/2009(H1N1)) ]
MSQLTEVETPTRSEWEKRCSDSSDPLVIAANIIGILHLILWITDRLFFKCIYRRFKYGLKRGFSTEGVPE
SMREFYQQEQSASVDVDDGHPVNIELE
```

Lampiran 6. Hasil pembuatan struktur 3D protein M2 *channel* dengan Hhpred

HOME | Login | PDBAlert | Personal Databases | Contact | Imprint | D

Bioinformatics Toolkit
Max-Planck Institute for Developmental Biology

Search | Alignment | Sequence Analysis | Zary Structure | 3ary Structure | Classification | Utils

CS-BLAST | FHMMEER | HHblits | HHpred | Hhsenser | NucBLAST | PSI-BLAST | PatternSearch | ProtBLAST | SimShiftD

HHpred - Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison [Help](#)
NEW: Official server results for CASP9 structure prediction benchmark

Input

Paste protein sequence or multiple alignment
 >gi|303385772|gb|ADM14979.1| matrix protein 2 [Influenza A virus (A/Adis/08/05)]
 MSQLPEVETPTSENECRCSDDPLVIAANIGILHLILUIDELFKCIYBDFKGLKGGPSTEGUPE
 SHREYQQGQSAVDQDGHFNIELE

or upload a local file

Select input format: FASTA

Search Options

Select HMM databases (hold Ctrl to select several)

Standard: pdb70_19Feb11, pdb_on_hold_17Feb11, scop70_1.75, cdd_12Jan11, Interpro_31.0

Genomes: Arabidopsis_thaliana, Caenorhabditis_elegans, Drosophila_melanogaster, Homo_sapiens, Mus_musculus

Max. PSI-BLAST iterations: 8

Score secondary structure: yes no predicted vs predicted only

Alignment mode: local global

Realign with MAC:

HHpred - Results Job-ID: 4015327 Date: 08:19 on Feb 24 2011

Results | Histogram | Show query alignment

Create model | Merge Q/T alignments | Save | Export

Color alignments: color only SS color alignments color alignments




Run PCOILS: HHpred has detected hits to coiled coil-containing proteins. Press button to run PCOILS prediction on your query

Query: gi|303385772|gb|ADM14979.1| (seq=MSQLPEVETPTSENECRCSDDPLVIAANIGILHLILUIDELFKCIYBDFKGLKGGPSTEGUPE Len=97 Neff=1.4 Nseqs=44)

Parameters: score SS=yes search:local realign with MAP:no

No Hit	Prob	E-value	P-value	Score	SS	Cols	Query HMM	Template HMM
<input type="checkbox"/> 1 2kih_R	Matrix protein 2; SS1N,	100.0	8.1E-37	3.4E-41	188.5	3.3	43	18-60 (43)
<input type="checkbox"/> 2 3bkd_R	Transmembrane domain of	99.7	2.2E-18	9.1E-23	97.2	3.0	25	22-46 (26)
<input type="checkbox"/> 3 2wql_R	Tumor protein P73; tumo	65.0	2.9	0.00012	25.5	2.0	17	65-81 (51)
<input type="checkbox"/> 4 2q7r_R	Arachidonate 5-lipoxyme	39.8	79	0.0033	21.9	6.9	59	24-85 (2-62 (161))
<input type="checkbox"/> 5 2d0b_R	RNAse HIII, ribonucleas	34.9	35	0.0015	25.0	4.0	39	21-65 (232-270 (310))
<input type="checkbox"/> 6 2kix_R	EM2 protein; channel, t	34.7	46	0.0019	18.7	3.6	21	26-46 (8-28 (33))
<input type="checkbox"/> 7 2knc_R	Integrin alpha-IIB; tra	34.6	48	0.002	20.1	3.9	23	26-50 (14-36 (54))
<input type="checkbox"/> 8 2knc_B	Integrin beta-3; transm	29.4	94	0.004	19.6	5.1	32	25-56 (16-48 (79))

Lampiran 7. Data Struktur 3 Dimensi Protein M2 Channel dari PDB


A MEMBER OF THE 
An Information Portal to Biological Macromolecular Structure
 As of Tuesday Feb 22, 2011 at 4 PM PST there are 71415 Structures  | [PDB Status](#)

[Contact Us](#) | [Print](#) |

MyPDB Hide

Login to your Account
Register a New Account

Home Hide

- [News & Publications](#)
- [Usage/Reference Policies](#)
- [Deposition Policies](#)
- [Website FAQ](#)
- [Deposition FAQ](#)
- [Contact Us](#)
- [About Us](#)
- [Careers](#)
- [External Links](#)
- [Sitemap](#)
- [New Website Features](#)

Deposition Hide

- [All Deposit Services](#)
- [Electron Microscopy](#)
- [X-ray | NMR](#)
- [Validation Server](#)
- [BioSync Beamline](#)
- [Related Tools](#)

Search Hide

- [Advanced Search](#)
- [Latest Release](#)
- [New Structure Papers](#)
- [Sequence Search](#)
- [Chemical Components](#)

[Summary](#) | [Sequence](#) | [Annotations](#) | [Seq. Similarity](#) | [3D Similarity](#) | [Literature](#) | [Biol. & Chem.](#) | [Methods](#) | [Geometry](#) | [Links](#)

S31N mutant of M2 proton channel

DOI:10.2210/pdb2kih/pdb

Primary Citation

Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel.

Pielak, R.M., Schnell, J.R., Chou, J.J.

Journal: (2009) Proc.Natl.Acad.Sci.USA **106**: 7379-7384

PubMed: 19383794

PubMedCentral: PMC2678642

DOI: 10.1073/pnas.0902548106


[Search Related Articles in PubMed](#)

PubMed Abstract:

The influenza A virus M2 proton channel equilibrates pH across the viral membrane during entry and across the trans-Golgi membrane of infected cells during viral maturation. It is an important target of adamantane-family antiviral drugs, but drug resistance has become... [[Read More & Search PubMed Abstracts](#)]

2KIH

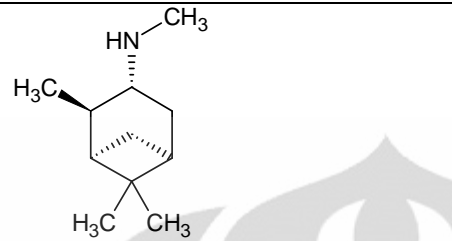
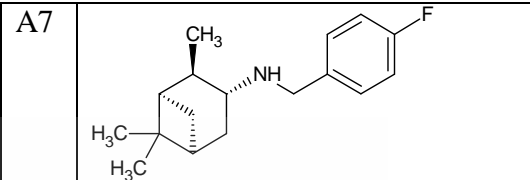
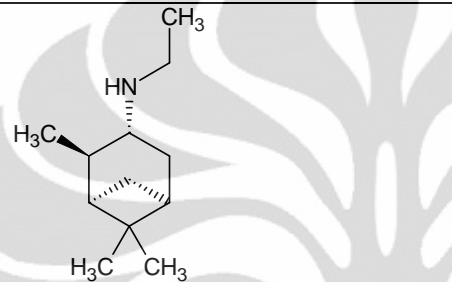
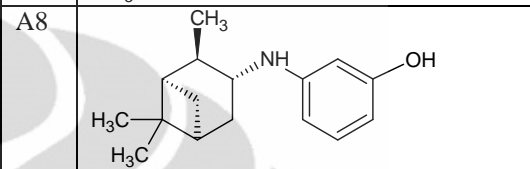
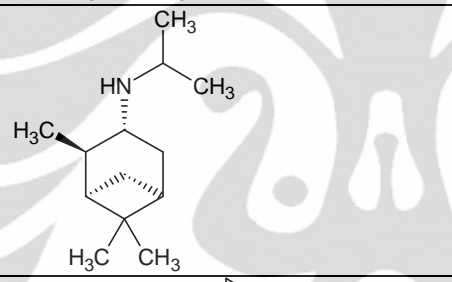
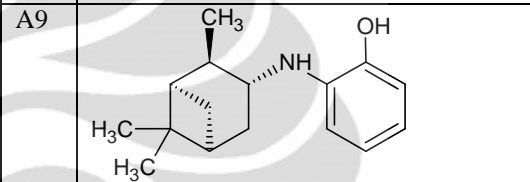
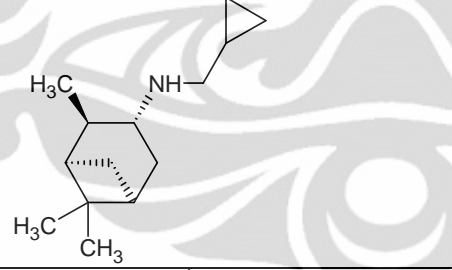
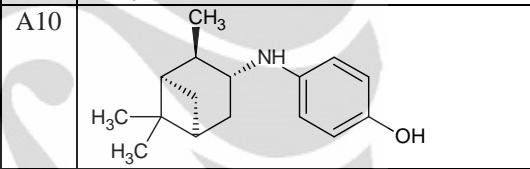
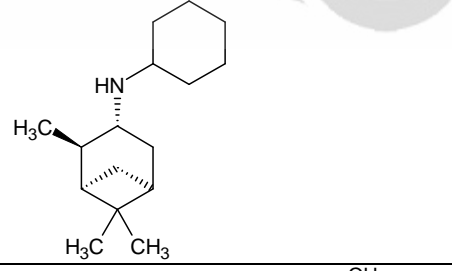
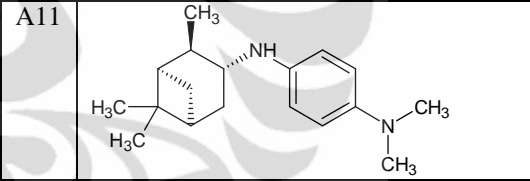
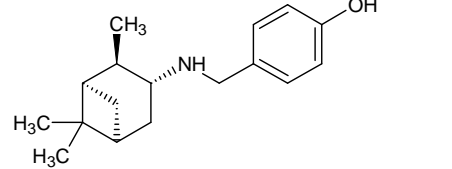
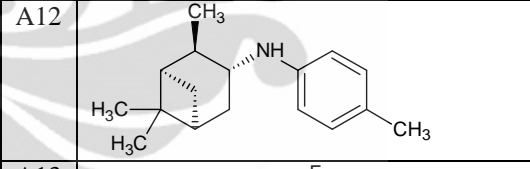
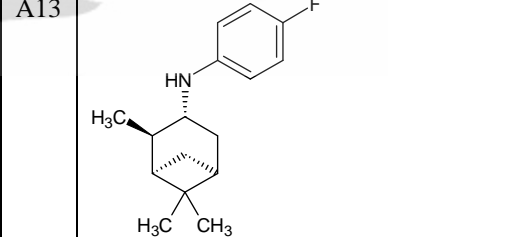
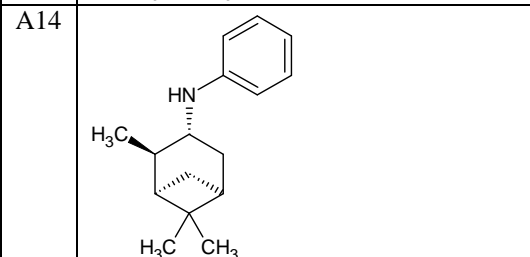
Structure Image

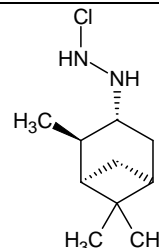
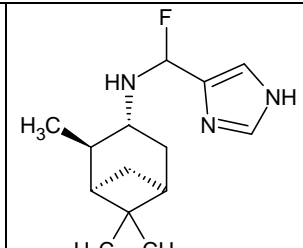
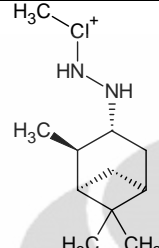
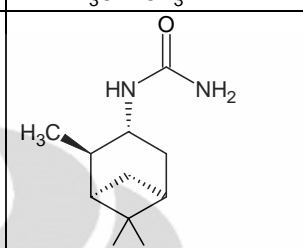
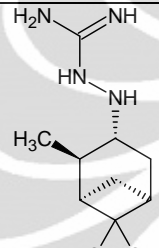
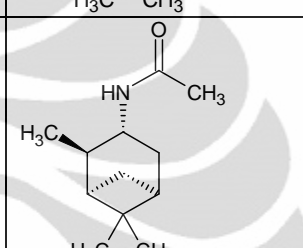
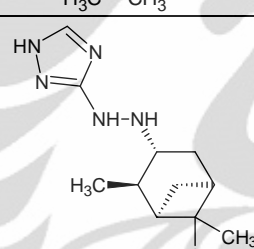
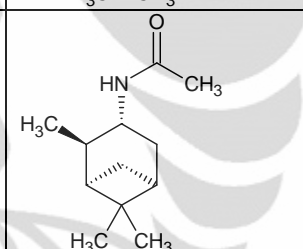
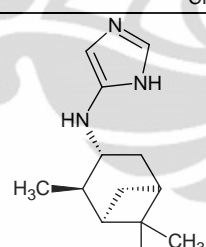
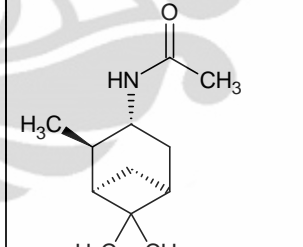
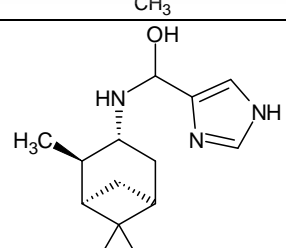
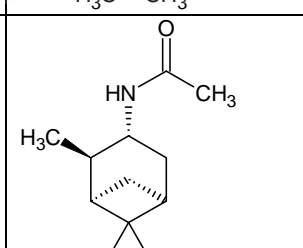


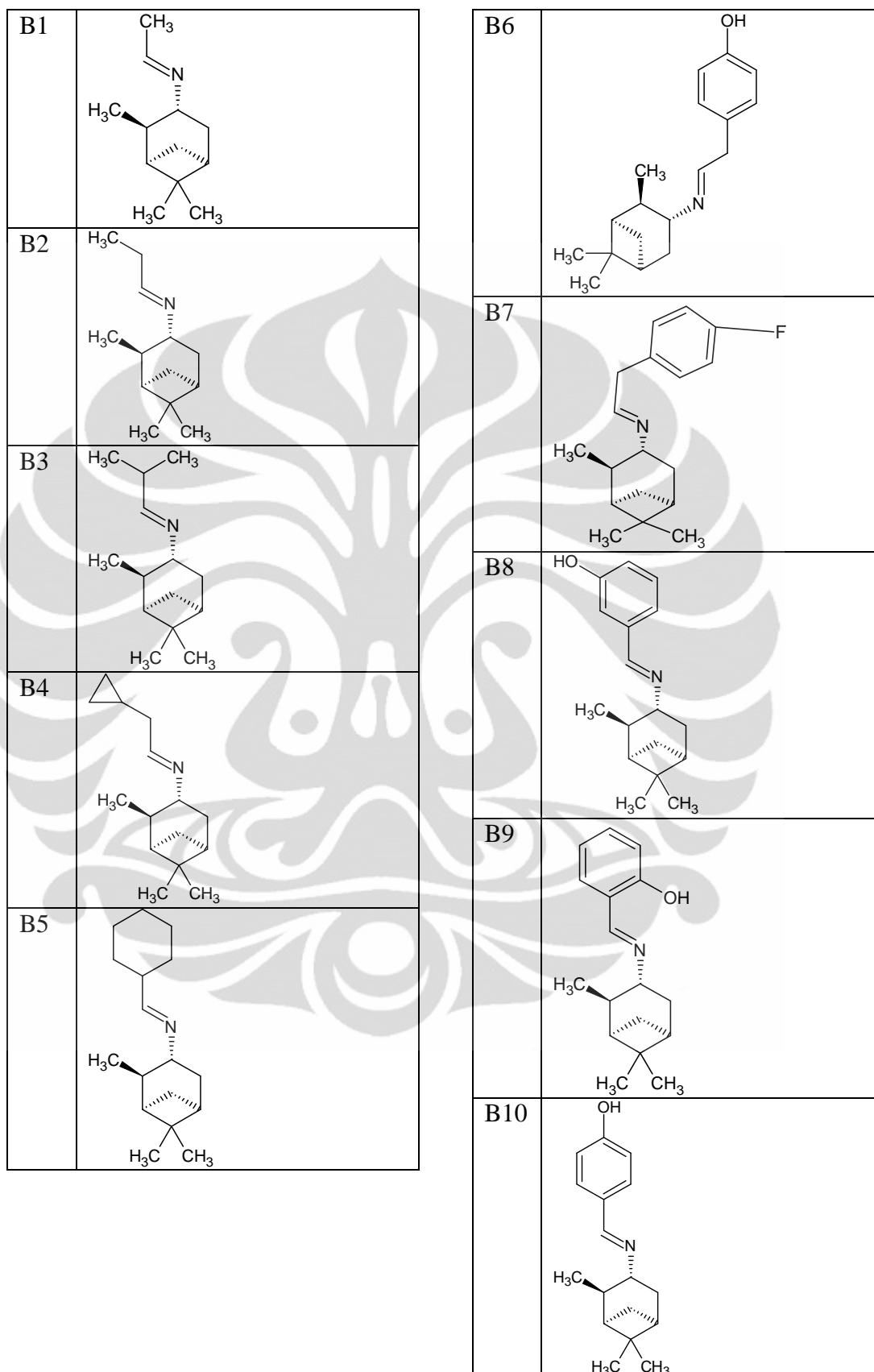
[More Images...](#)

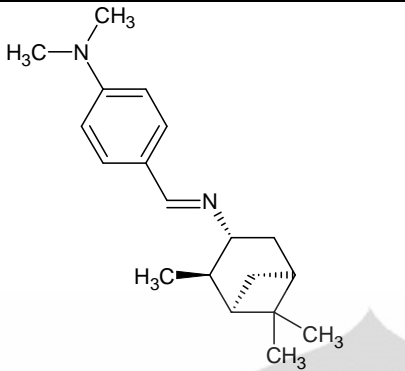
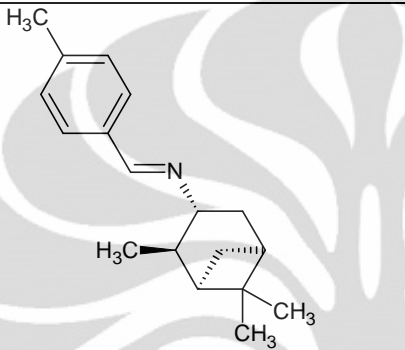
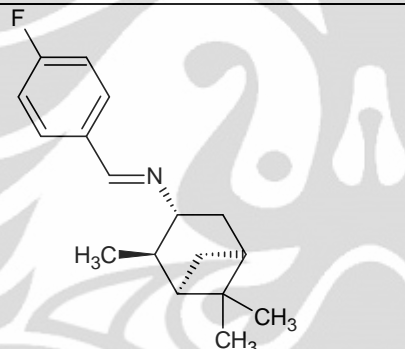
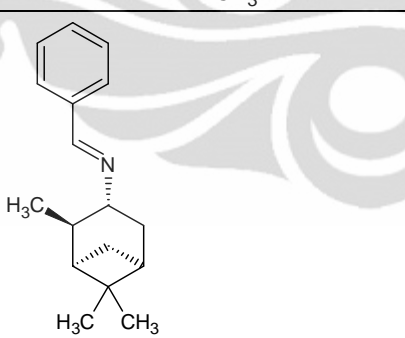
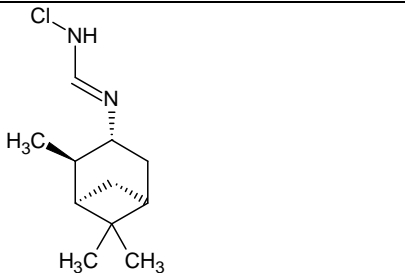
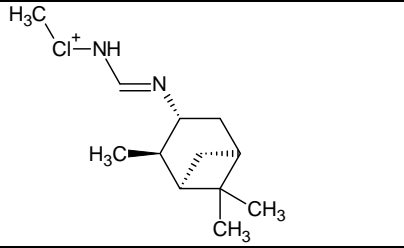
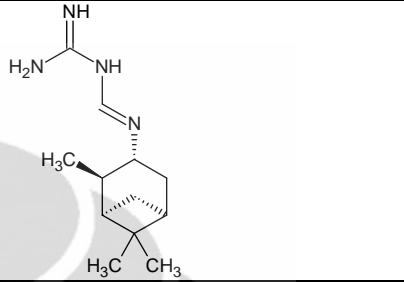
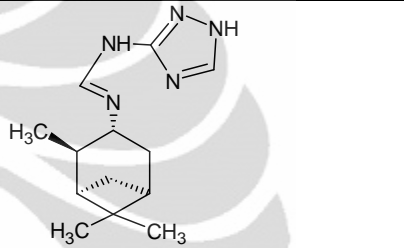
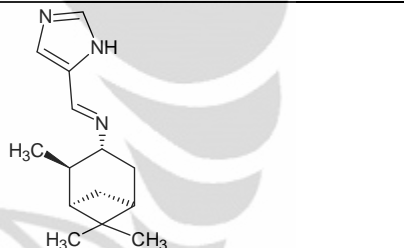
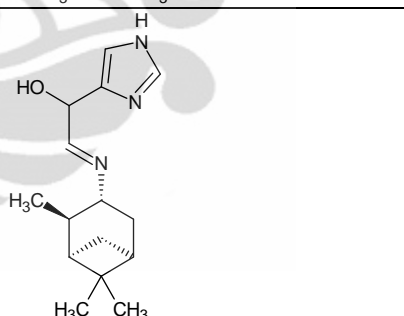
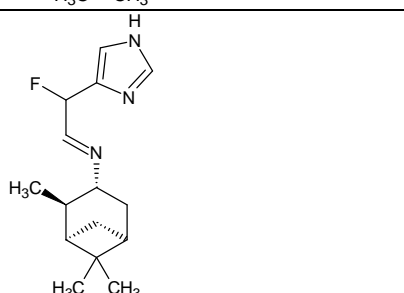
Lampiran 8. Table rancangan ligan modifikasi (1R,2R,3R,5S)-(-)-

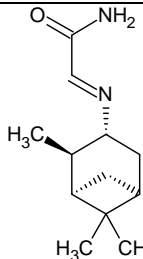
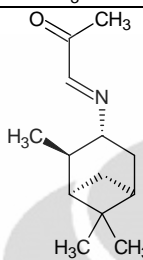
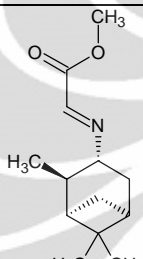
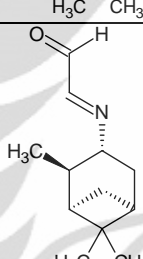
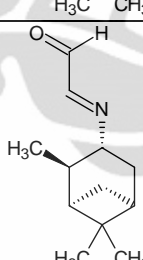
isopinocampheylamine

A1		A7	
A2		A8	
A3		A9	
A4		A10	
A5		A11	
A6		A12	
		A13	
		A14	

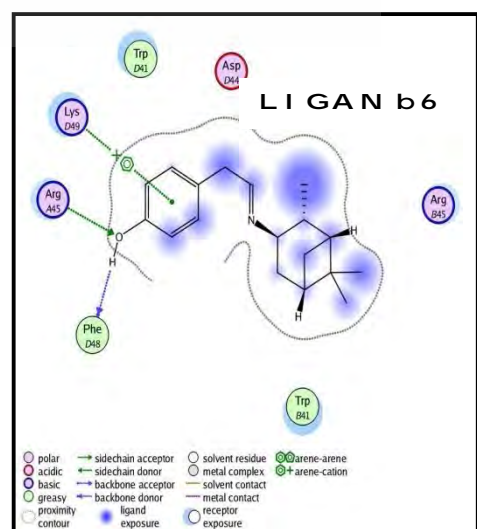
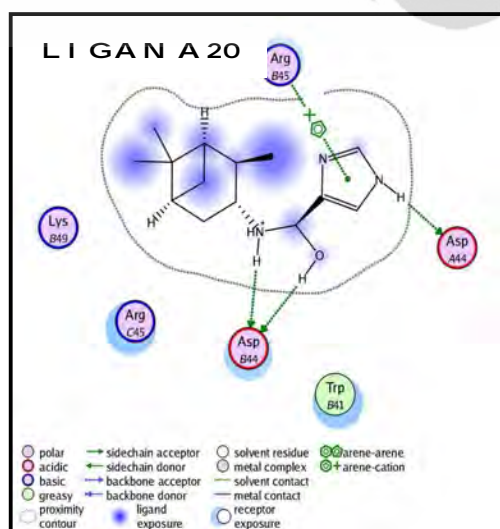
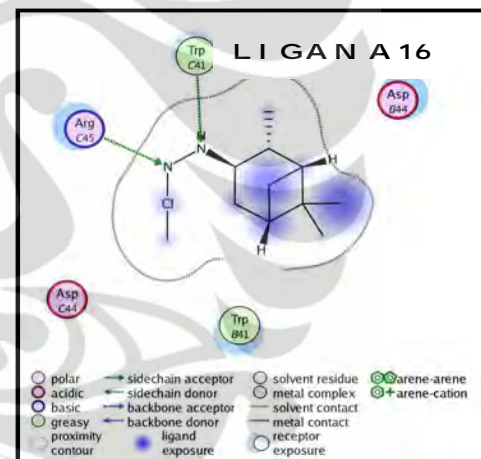
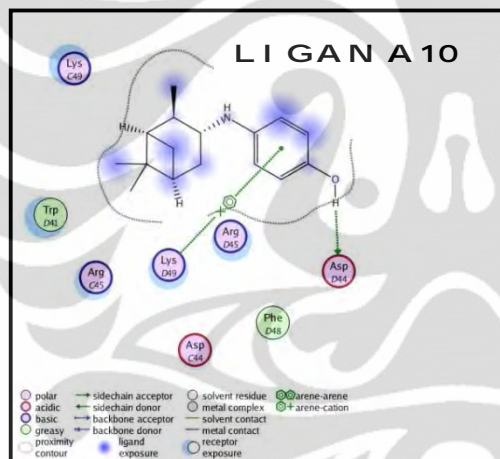
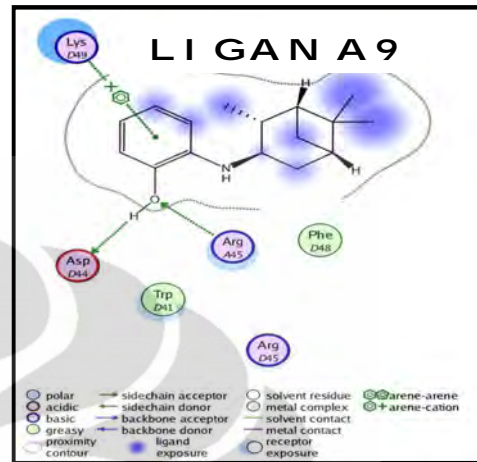
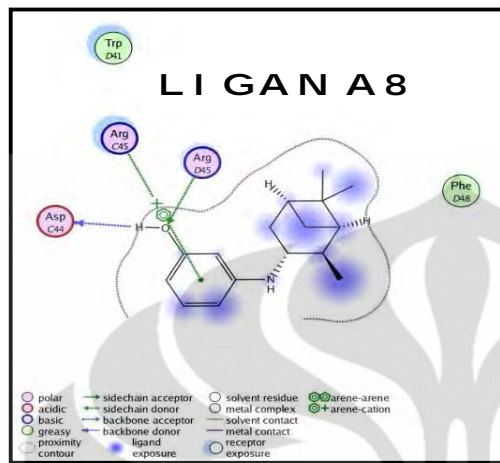
A15		A21	
A16		A22	
A17		A23	
A18		A24	
A19		A25	
A20		A26	



B11	
B12	
B13	
B14	
B15	
B16	
B17	
B18	
B19	
B20	
B21	

B22	 <chem>CC1(C)C[C@H](N=C/C(=O)N)C1C</chem>
B23	 <chem>CC1(C)C[C@H](N=C/C(=O)C)C1C</chem>
B24	 <chem>CC1(C)C[C@H](N=C/C(=O)OC)C1C</chem>
B25	 <chem>CC1(C)C[C@H](N=C/C=O)C1C</chem>
B26	 <chem>CC1(C)C[C@H](N=C/C=O)C1C</chem>

Lampiran 9. Hasil Interaksi 10 Ligan Terbaik



Lampiran 9. Hasil Interaksi 10 Ligan Terbaik (lanjutan)

