



UNIVERSITAS INDONESIA

ANALISIS AKTIVITAS EPITOPE NETRALISASI
HEMAGGLUTININ VIRUS H5N1 STRAIN NON-INDONESIA DAN
INDONESIA DENGAN INTRODUKSI ANTIBODI 8H5
MENGUNAKAN SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

CENMIDTAL CUACA MULYANTO

0304020175

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FISIKA

DEPOK

APRIL 2010

i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Cenmidtal Cuaca Mulyanto

NPM : 0304020175

Tanda tangan :

Tanggal : 20 Mei 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Cenmidtal Cuaca Mulyanto

NPM : 0304020175

Program Studi : Fisika

Judul Skripsi : Analisis Aktivitas Epitope Netralisasi
Hemagglutinin Virus H5N1 Strain Non-Indonesia dan
Indonesia dengan Introduksi Antibodi 8H5
Menggunakan Simulasi Dinamika Molekuler

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

Dewan Penguji

Pembimbing : Prof. Dr. rer. nat. Rosari Saleh (.....)

Penguji I : Dr. rer. nat. Mussaddiq Musbach (.....)

Penguji II : Dr. Efta Yudiarsah (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Mei 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadiran Allah Subhana Wa Ta'ala, atas berkat rahmat, nikmat dan karuniaNYA-lah saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, saya selaku penulis ingin menyampaikan penghargaan dan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam proses penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Rosari Saleh sebagai pembimbing penelitian dan skripsi ini, yang memberikan masukan yang bermanfaat dan memperbarui semangat saya untuk mendapatkan yang terbaik.
2. Dr. Mussaddiq Musbach dan Dr. Efta Yudiarsah yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaga untuk menguji dan memberikan masukan pada skripsi ini.
3. Seluruh staf, karyawan, terutama mba Ratna, dan mas Mardi. Staf pengajar jurusan Fisika, FMIPA, Universitas Indonesia, tak lupa pula para staf di dekanat FMIPA.
4. Tim penelitian Prof. Dr. Rosari Saleh yang senantiasa membantu dalam memotivasi penyusunan skripsi ini, yaitu, Sigit, Khari, Mbak Lusi, Daniel, Hendro, Andy, Yonnes, dan Dita.
5. Keluarga besar saya sendiri, yakni kepada Papa, mama, dan mbak Inda yang selalu memberikan segala bantuan dan selalu memberikan dorongan moral. *I'll pay y'all back one day.*
6. Teman-teman Fisika Material angkatan 2004, Agung, Ali, Juan, Irwanto, Sandy, Doya, Nidya, Sarif dan teman – teman Fisika 2004 yang lain seperti Sugi, Zamroni, Dony, Ais, Acha, Rendy, dan yang tak mungkin dapat disebutkan satu persatu.
7. Gilang, Rizki, Indira, Dian, Irvan, Lila, dan teman – teman yang membantu di masa – masa kejenuhan dan kepenatan dalam menyusun skripsi ini.

8. Sutarto dan dr.Budi yang memberikan masukan awal dalam penyusunan skripsi ini.
9. Ding Ming Chee dari Accelrys Singapore yang memberikan *software* Discovery Studio 2.1.

Serta kepada seluruh pihak yang tidak mungkin dapat disebutkan semuanya namun memberikan kontribusi yang cukup berarti pada penyusunan skripsi ini. Akhir kata, saya hanya mampu berdoa dan berharap, semoga skripsi dan penelitian yang dilakukan berbuah dan bermanfaat tidak hanya untuk negara Republik Indonesia kita tercinta, namun juga untuk seluruh dunia.

Depok, 20 Mei 2010

Cenmidtal Cuaca Mulyanto

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

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

Nama : Cenmidtal Cuaca Mulyanto

NPM : 0304020175

Program Studi : Fisika Material dan Zat Mampat

Departemen : Fisika

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 :

Analisis Aktivitas Epitope Netralisasi Hemagglutinin Virus H5N1 Strain Non-Indonesia dan Indonesia dengan Introduksi Antibodi 8H5 Menggunakan Simulasi Dinamika Molekuler

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, Indonesia

Pada tanggal : 20 Mei 2010

Yang menyatakan

(Cenmdital Cuaca Mulyanto)

ABSTRAK

Nama : Cenmidtal Cuaca Mulyanto

Program Studi : Fisika Material dan Zat Mampat

Judul : Analisis Aktivitas Epitope Netralisasi Hemagglutinin Virus H5N1 Strain Non-Indonesia dan Indonesia dengan Introduksi Antibodi 8H5 Menggunakan Simulasi Dinamika Molekuler

Sebagai upaya dalam memahami netralisasi virus H5N1 oleh antibodi manusia, simulasi dinamika molekuler dua kompleks antibodi-antigen dilakukan. Tiga struktur molekul yang membentuk dua kompleks tersebut dibentuk termasuk antigen hemagglutinin Vietnam 2IBX, hemagglutinin Indonesia CDC, dan fragmen variabel dari antibodi 8H5 atau 8H5Fv. Dalam penelitian ini kompleks 8H5Fv-2IBX dan 8H5Fv-CDC diproduksi melalui pemodelan struktur molekul, *homology modeling*, dan *molecular docking*. Dua kompleks tersebut lalu melewati simulasi dinamika molekuler selama 2 nanosekon untuk menginvestigasi kestabilan struktur kompleks dan aktivitas netralisasi yang dapat diamati dengan berfokus pada epitope netralisasi masing – masing hemagglutinin yang didapatkan hasil *molecular docking*. Didapatkan bahwa sifat dinamis atom – atom pembentuk molekul tidak menihilkan aktivitas netralisasi. Dengan mengamati epitope netralisasi masing – masing hemagglutinin juga didapatkan bahwa aktivitas netralisasi lebih efektif pada hemagglutinin 2IBX (Vietnam) dibandingkan dengan hemagglutinin Indonesia (CDC) berdasarkan kalkulasi *solvent accessible surface* (SAS), energi, *root mean square displacement* (RMSD), dan analisis okupansi ikatan hidrogen.

Kata Kunci: Simulasi Dinamika Molekuler, Epitope Netralisasi, Antibodi, Hemagglutinin, *Molecular Docking*

ABSTRACT

Name : Cenmidtal Cuaca Mulyanto

Study Program: Material and Condensed Matter Physics

Title : Analysis of Neutralising Epitope Activity of a Non-Indonesian and an Indonesian H5N1 Virus' Hemagglutinin Introduced with an 8H5 Antibody using Molecular Dynamics Simulation

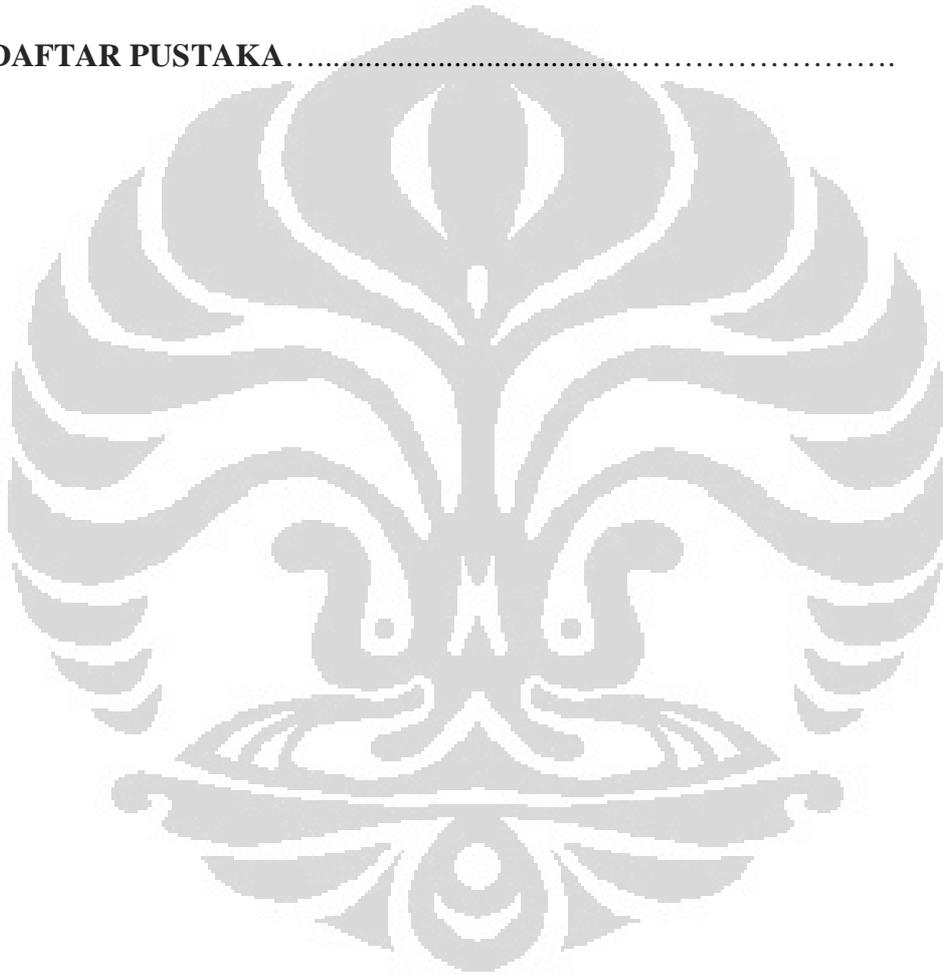
In an effort to study the H5N1 virus neutralisation by a human antibody, molecular dynamics simulations on two antibody-antigen complexes were conducted. Three molecular structures were formed in this study including the Vietnamese hemagglutinin 2IBX, the Indonesian hemagglutinin CDC, and a variable fragment of the 8H5 antibody or 8H5Fv. In this study the complexes 8H5Fv-2IBX and 8H5Fv-CDC, that were produced by molecular modeling, homology modeling and molecular docking, was subjected to a 2 nanosecond molecular dynamics simulation each to investigate the stability of such complexes and the maintenance of the neutralising activity that was observed by focusing on the neutralising epitopes that were predicted by molecular docking. It is was found that the dynamic nature of the molecules in study did not negate the steric hindrance occurring from the antibody variable fragment 8H5Fv with the hemagglutinins, therefore suggesting that the 8H5 antibody should be able to neutralise these two hemagglutinins. By solvent accessible surface (SAS) calculations, energy analysis, root mean square displacement (RMSD) analysis, and also hydrogen bond occupancy it was also found that the the 8H5Fv seem to be more effective against the 2IBX (Vietnamese) hemagglutinin than against the CDC (Indonesian) hemagglutinin.

Key Words: Molecular Dynamics Simulation, Neutralizing Epitope, Antibody, Hemagglutinin, Molecular Docking

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TEORI VIRUS H5N1 DAN ANTIBODI.....	7
2.1 Virus H5N1.....	8
2.1.1 Struktur Virus Influenza A H5N1.....	8
2.1.2 Siklus Hidup Virus H5N1.....	10
2.1.3 Hemagglutinin.....	11
2.2 Antibodi.....	13
2.3 Interaksi Antibodi dan Antigen dalam Netralisasi Virus.....	15
BAB III TINJAUAN PUSTAKA.....	18
BAB IV METODE PENELITIAN DAN METODE PERHITUNGAN.....	25
4.1 Metode Penelitian.....	25
4.1.1 Pemodelan Struktur Model.....	26
4.1.2 <i>Molecular Docking</i>	27
4.1.3 Penentuan Epitope Netralisasi.....	28
4.2 Metode Perhitungan.....	29
4.2.1 Mekanika Kuantum – <i>Density Functional Theory</i>	29
4.2.2 Mekanika Molekuler.....	32
4.2.3 Metode Mekanika Kuantum/ Mekanika Molekuler (QM/MM).....	34

BAB V HASIL DAN DISKUSI.....	40
5.1 Pemodelan Struktur.....	40
5.1.1 HA – 2IBX.....	40
5.1.2 HA – CDC.....	42
5.1.3 Antibodi – 8H5.....	55
5.2 <i>Molecular Docking</i>	59
5.3 Simulasi Dinamika Molekuler (SDM).....	73
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	93
DAFTAR PUSTAKA.....	95



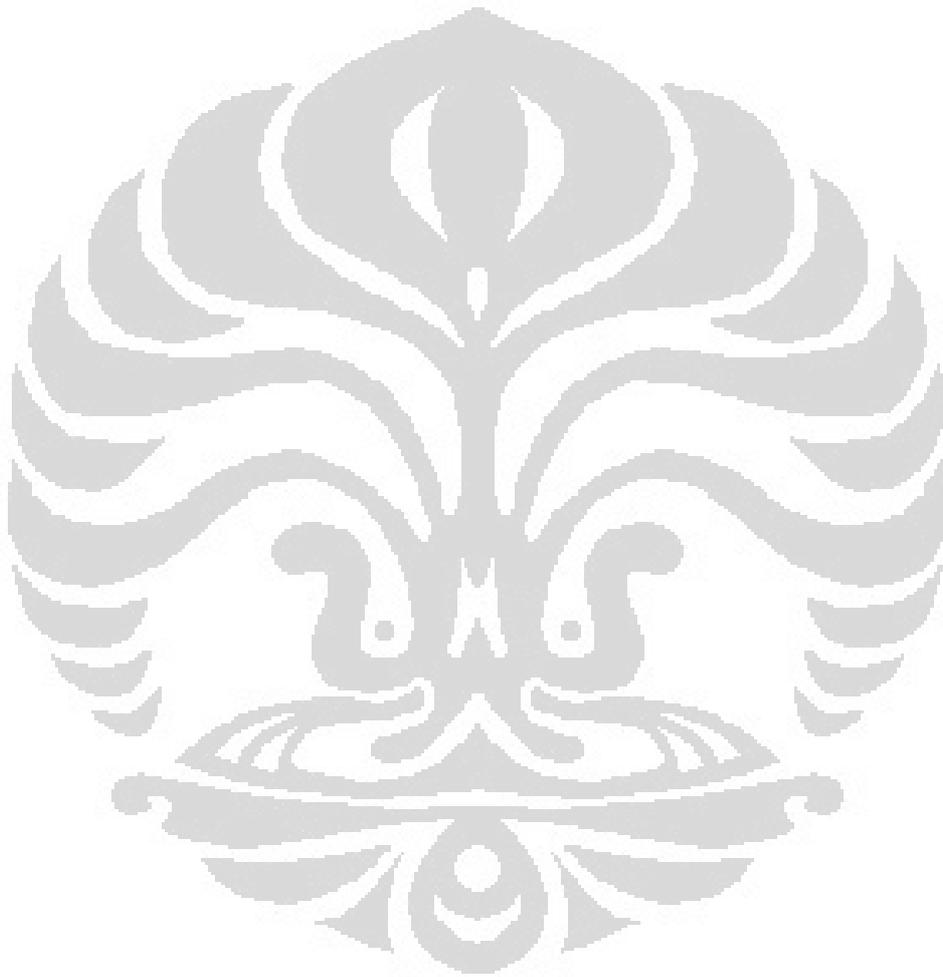
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Peta dunia dengan negara – negara yang melaporkan kasus flu burung. Negara – negara dengan kasus flu burung diwarnai merah.....	2
Gambar 1.2	Satu kali bersin dapat menghasilkan sekitar 5000 droplet lendir bervirus yang dikeluarkan di udara.....	3
Gambar 2.1	Struktur virus influenza A.....	9
Gambar 2.2	Siklus replikasi virus influenza A.....	10
Gambar 2.3	Model struktur HA.....	11
Gambar 2.4	Model struktur molekul HA.....	12
Gambar 2.5	Proses fusi membran HA dengan membran sel	13
Gambar 2.6	Macam – macam antibodi yang terdapat dalam tubuh manusia.....	14
Gambar 2.7	Struktur umum antibodi IgG	15
Gambar 2.8	Netralisasi virus oleh antibodi.....	16
Gambar 3.1	Posisi hasil docking masing – masing HA dengan 8H5 yang disuperposisi (Yan et.al.).....	21
Gambar 3.2	Tabel yang mengilustrasikan sembilan sistem yang Disimulasi (Schulten et.al.).....	22
Gambar 3.3	Obat Tamiflu and Relenza berikatan secara stabil dengan H1N1, H5N1, and H1N1A.....	23
Gambar 4.1	Bagan alur penelitian.....	26
Gambar 4.2	Diagram skematik proses <i>molecular docking</i>	27
Gambar 4.3	Proses penggambaran SAS oleh probe sphere.....	29
Gambar 4.4	SAS dari asam amino Alanin.....	29
Gambar 4.5	Vibrasi molekul diatomik	33
Gambar 4.6	<i>Bending</i> molekul.....	33
Gambar 4.7	Penggambaran interaksi Urey -Bradley.....	33
Gambar 4.8	Penggambaran rotasi torsional.....	34
Gambar 4.9	Penggambaran <i>out of plane bending</i>	34

Gambar 4.10	Pembagian domain antara MM dan QM.....	35
Gambar 4.11	Pembagian domain kuantum I dan domain klasikO.....	36
Gambar 4.12	Visualisasi atas model <i>Generalized Born</i>	38
Gambar 5.1	<i>Isolasi rantai A(kanan) dari HA 2IBX utuh</i>	41
Gambar 5.2	<i>Sequence alignment</i> antara 2IBX dan CDC.....	42
Gambar 5.3	Struktur 3D CDC setelah minimisasi.....	43
Gambar 5.4	2IBX yang di-fitting dengan CDC setelah masing – masing melalui minimisasi energi.....	45
Gambar 5.5	Mutasi R53K.....	46
Gambar 5.6	Mutasi V86T	47
Gambar 5.7	Mutasi D94S.....	47
Gambar 5.8	Mutasi S124D	48
Gambar 5.9	Mutasi L129S.....	49
Gambar 5.10	Mutasi Q138L.....	50
Gambar 5.11	Mutasi L140S dan S141P	50
Gambar 5.12	Mutasi R162K.....	51
Gambar 5.13	Mutasi D183N, A184E, dan A185E.....	52
Gambar 5.14	Mutasi V200I.....	52
Gambar 5.15	Mutasi R212K.....	53
Gambar 5.16	Mutasi T263A.....	54
Gambar 5.17	Mutasi G272S.....	55
Gambar 5.18	Mutasi N309S.....	55
Gambar 5.19	Struktur 3D Fragmen variabel (Fv) 8H5.....	58
Gambar 5.21	Kompleks 8H5 – 2IBX. 2IBX digambarkan dengan memperlihatkan SAS berwarna merah.....	62
Gambar 5.22	Kompleks 8H5 – CDC. CDC digambarkan dengan memperlihatkan SAS berwarna biru.....	63
Gambar 5.23	Kompleks 8H5-2IBX. Rantai backbone biomolekul dalam kompleks divisualisasikan sebagai kawat tebal.....	64
Gambar 5.24	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus OH Asp72 dengan gugus OC Tyr49 rantai L.....	67

Gambar 5.25	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asn76 dengan Tyr50 dan Ser52 rantai L 8H5.....	68
Gambar 5.26	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Glu116 dengan Ser67 rantai L 8H5.....	68
Gambar 5.27	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Lys117 dengan Ser52 rantai L 8H5.....	69
Gambar 5.28	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr141 dengan Asp101 rantai H 8H5.....	69
Gambar 5.29	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr256 dengan Leu54 rantai L 8H5.....	69
Gambar 5.30	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asp84 dengan Tyr50.....	70
Gambar 5.31	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asn88 dengan Tyr49 rantai L dan Tyr99 rantai H.....	71
Gambar 5.32	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr153 dengan Asp 97 dan Tyr99 rantai H.....	71
Gambar 5.33	Permukaan molekul 2ibx yang didefinisikan sebagai epitope netralisasi.....	72
Gambar 5.34	Permukaan molekul CDC yang didefinisikan sebagai epitope netralisasi.....	73
Gambar 5.35	Hasil simulasi 8H5Fv-2IBX.....	77
Gambar 5.36	Hasil simulasi 8H5Fv-CDC.....	78
Gambar 5.37	Kurva energi hasil simulasi 8H5Fv-2IBX.....	79
Gambar 5.38	Kurva energi hasil simulasi 8H5Fv-CDC.....	81
Gambar 5.39	Komponen-komponen energi kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu simulasi berdasarkan medan gaya CharmM.....	83
Gambar 5.40	Komponen-komponen energi kompleks 8H5-CDC terhadap waktu simulasi berdasarkan medan gaya CharmM.....	85
Gambar 5.41	Kurva RMSD epitope netralisasi 2IBX terhadap waktu simulasi.....	87
Gambar 5.42	Kurva RMSD epitope netralisasi CDC terhadap waktu simulasi.....	88

Gambar 5.43 Okupansi ikatan hidrogen pada daerah interaksi 8H5-2ibx selama simulasi.....	90
Gambar 5.44 Okupansi ikatan hidrogen pada daerah interaksi 8H5-CDC selama simulasi.....	91
Gambar 5.45 Daerah 2ibx dan CDC yang dihalangi oleh 8H5 sepanjang simulasi diindikasikan oleh warna merah.....	92



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Daftar kasus manusia yang terjadi di 15 negara dari 2003 hingga 2009.....	1
Tabel 5.1	Residu Asam Amino 2IBX yang mengalami mutasi sehingga menjadi CDC.....	44
Tabel 5.2	Δ SAS 2IBX.....	65
Tabel 5.3	Δ SAS CDC.....	66
Tabel 5.4	Parameter SDM untuk kedua kompleks 8H5-HA.....	75
Tabel 5.5	Δ SAS asam amino pembentuk epitope netralisasi pada 2IBX dari hasil molecular docking setelah SDM.....	88
Tabel 5.6	Δ SAS asam amino pembentuk epitope netralisasi pada CDC dari hasil molecular docking setelah SDM.....	89

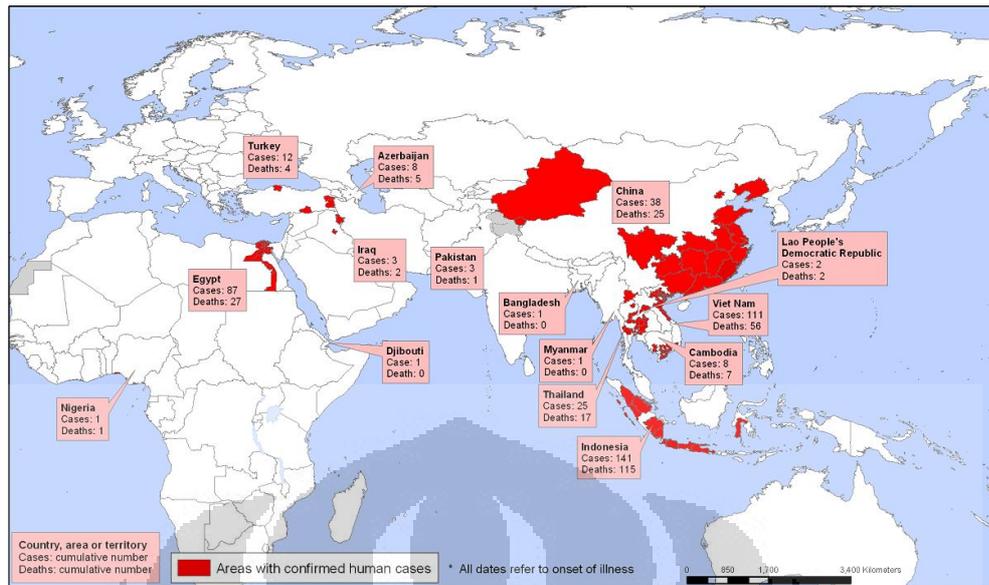
BAB I

PENDAHULUAN

Pada tahun 2003 dunia mengalami ancaman pandemi wabah penyakit yang dinamakan *avian influenza* atau lebih dikenal sebagai flu burung dengan meninggalnya tiga pasien yang mengidap penyakit ini. Korban yang meninggal akibat flu burung berasal dari Cina dan Vietnam. Pada tahun – tahun berikutnya flu burung lalu menyebar ke daerah Asia Tenggara lainnya termasuk Thailand, Myanmar, Kamboja, Laos, dan Indonesia. Pada tahun 2006 WHO melaporkan rasio mortalitas akibat flu burung di Indonesia amat suram yakni satu dari dua orang Indonesia terjangkit flu burung berpotensi untuk meninggal. Tidak hanya itu, jangkauan kasus flu burung pun kian menyebar hingga memasuki daerah Timur Tengah dan Afrika Utara seperti Azerbaijan, Irak, dan Mesir. Sampai sekarang ada 15 negara yang dilaporkan memiliki kasus flu burung dengan Indonesia di peringkat satu sebagai negara dengan jumlah kasus terbanyak. Data kasus 15 negara tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.1 sementara negara – negara yang melaporkan kasus flu burung dapat dilihat pada Gambar 1.1.[1,2]

Tabel 1.1 Daftar kasus manusia yang terjadi di 15 negara dari 2003 hingga 2009. (Data diambil dari World Health Organization, 2010)

Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		Total	
	cases	deaths														
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	1	0	9	7
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	7	4	38	25
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	39	4	90	27
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	20	19	161	134
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's Democratic Republic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	5	5	112	57
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	44	33	72	32	467	282



Gambar 1.1 Peta dunia dengan negara – negara yang melaporkan kasus flu burung. Negara – negara dengan kasus flu burung diwarnai merah. (Diambil dari situs World Health Organization)

Penyebab penyakit flu burung adalah virus influenza H5N1. Virus yang tadinya hanya menyerang unggas sekarang dapat menyerang manusia. Penyebaran virus H5N1 mulanya terjadi pada unggas. Namun, burung yang memiliki kecenderungan untuk bermigrasi dapat menyebarkan virus H5N1 kepada burung di daerah tempat tujuan migrasi. Sedangkan manusia dapat terinfeksi virus H5N1 akibat kontak langsung dengan burung yang sakit atau kontak dengan kotoran – kotoran burung yang sakit. Sementara penyebaran virus H5N1 antar manusia dapat diakibatkan oleh hal yang sama dengan penularan influenza pada umumnya yaitu lewat kontak langsung melalui *droplet – droplet* lendir yang dikeluarkan manusia ketika bersin [3,4].

Penyakit influenza pada manusia umumnya ditanggulangi dengan vaksinasi. Dan untuk virus H5N1 hal yang sama dilakukan untuk memerangi penyebaran virus H5N1. Vaksin sendiri terbuat dari virus yang sudah disterilkan (supaya tidak dapat menginfeksi tubuh) dan bekerja dengan dimasukkan ke dalam tubuh untuk merangsang sel imun tubuh memproduksi antibodi yang dapat menetralkan virus aktif. Telah banyak vaksin virus H5N1 yang dikembangkan oleh berbagai negara namun vaksin H5N1 memiliki kendala yang sama dengan vaksin virus influenza lainnya, yakni vaksin bersifat sementara dan cenderung

hanya ampuh untuk melawan virus influenza yang ada pada saat waktu vaksin dikembangkan namun keampuhannya tidak bisa dijamin bila digunakan terhadap strain virus baru yang muncul di kemudian hari [4]. Dengan adanya rintangan tersebut maka berbagai pihak berupaya untuk mengembangkan suatu vaksin H5N1 yang bersifat universal dimana cakupan virus yang dapat dinetralisasi luas sehingga strain yang akan muncul di kemudian hari pun dapat ternetralisasi.



Gambar 1.2 Satu kali bersin dapat menghasilkan sekitar 5000 droplet lendir bervirus yang dikeluarkan di udara [4].

Pengembangan vaksin terlebih dahulu dapat dilakukan dengan mempelajari bagaimana antigen utama virus H5N1. Antigen yang bertugas untuk berikatan dengan sel yang akan diinfeksi, yaitu Hemagglutinin (HA), dapat dinetralisasi dengan menggunakan suatu antibodi. Hal ini bisa dipelajari melalui dua pendekatan, yaitu secara eksperimental dan komputasional.

Secara eksperimen, penelitian yang melibatkan antibodi dan pengaruhnya terhadap virus H5N1 tersebut dapat dilakukan dengan metode *hemagglutination inhibition test* (HI), *viral neutralization test*, dan ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) test. *Hemagglutination test* merupakan sebuah teknik uji untuk mengukur jumlah antigen, antibodi, atau virus tertentu menggunakan kemampuan mereka untuk melekat pada *erythrocyte* (sel darah merah yang membawa oksigen). Sementara, *viral neutralization test* merupakan sebuah teknik uji untuk mengukur jumlah virus dan antibodi yang diinokulasikan ke

dalam suatu kultur sel, telur, atau binatang. Sedangkan ELISA *test* merupakan suatu teknik uji dengan tujuan yang sama dengan dua teknik uji sebelumnya tapi berbeda dari segi mekanisme karena ELISA *test* lebih menyerupai spektroskopi fluoresen. Pada ELISA *test*, suatu antigen dengan jumlah yang tidak diketahui berada pada suatu permukaan dan suatu antibodi tertentu ditambahkan pada permukaan tersebut supaya antibodi dapat berikatan dengan antigen. Antibodi tersebut sebelumnya ditambahkan sebuah enzim yang dapat menghasilkan signal yang bisa dideteksi dan saat lapisan antigen-antibodi disinari cahaya dengan panjang gelombang tertentu sampel akan bersinar secara fluoresen dan jumlah antigen di sampel dapat ditentukan dari intensitas cahaya yang diproduksi sampel yang fluoresen [5].

Kendala dalam menjalankan eksperimen – eksperimen seperti yang telah dijelaskan di atas berikatan dengan waktu dan biaya. Di samping itu kesulitan juga dijumpai karena lingkungan eksperimen harus dijaga ketat supaya eksperimen tetap terkendali dan tidak tercemar dan bila terjadi kesalahan sedikitpun dalam menjalankan eksperimen, maka eksperimen harus diulang dan pada intinya memakan waktu dan biaya yang besar. Untuk mengatasi hal-hal tersebut maka suatu pendekatan secara komputasional dikembangkan sebagai alternatif pendekatan eksperimen. Dengan komputer interaksi antibodi – antigen dapat divisualisasi dalam skala molekuler hingga atomik tanpa kesulitan yang dijumpai pada eksperimen. Dan dalam pendekatan secara komputasi inilah fisika memiliki peran yang penting.

Aplikasi fisika dalam studi mengenai biomolekul sudah mencakupi hal yang bisa disebutkan sebagai inter-displin. Tidak hanya menjadi dasar untuk ilmu-ilmu seperti rekayasa elektronik dan mesin atau arsitektur bangunan, fisika sudah dapat diaplikasikan ke dalam permasalahan biologi karena substansi biologi terdiri dari protein yang tidak lebih dari kumpulan molekul yang tidak lain terdiri dari atom - atom. Dalam sudut pandang fisika, aktifitas biologi yang terjadi dapat dijelaskan dari susunan geometri atom-atom penyusun, energi relatif, dan sifat intrinsik molekul-molekul (momen dipol, polarisabilitas, dan lain-lain) suatu sistem biologis [6].

Aplikasi fisika dalam sistem biomolekul dapat lebih terlihat saat menggunakan simulasi dinamika molekuler (SDM) untuk visualisasi dinamika atom – atom penyusun biomolekul saat interaksi berlangsung. Dalam SDM, fisika digunakan untuk menentukan bagaimana suatu atom bergerak dan berinteraksi dengan atom – atom penyusun lain sehingga gambaran detail mengenai keadaan suatu sistem dapat terlihat jelas selama waktu simulasi. SDM penting digunakan dalam meneliti struktur biomolekul sebab pada kenyataan biomolekul tidak selalu dalam keadaan yang diam sehingga SDM merupakan modus yang digunakan untuk memahami pergerakan yang dialami biomolekul tersebut.

Dalam penelitian ini SDM digunakan untuk mengamati suatu bagian tertentu pada HA yang dinamakan epitope netralisasi, yaitu daerah HA yang berinteraksi dengan antibodi dan memicu antibodi untuk menetralkan HA agar berikatan dengan sel tubuh. Epitope netralisasi memiliki peran signifikan dalam desain vaksin, sebab daerah yang dapat merangsang antibodi tersebut harus direproduksi untuk membuat suatu vaksin yang ampuh. Dari segi penelitian, pengamatan terhadap daerah ini lebih mudah diamati dengan menggunakan komputer dibandingkan dengan eksperimen sebab pada eksperimen pengamatan lebih berdasarkan kuantitas rasio netral/tidak netralnya virus terhadap antibodi. Sementara dengan menggunakan komputer daerah HA yang ternetralkan oleh suatu antibodi dapat diamati secara langsung.

Fokus utama penelitian ini adalah analisis terhadap aktivitas epitope netralisasi dari dua sistem antibodi – HA. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi yang telah dikultur di laboratorium Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Cina dan diberi nama 8H5 sedangkan HA yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dua strain HA yaitu HA dari virus H5N1 asal pasien Vietnam dan HA dari virus H5N1 asal pasien Indonesia. Dalam penelitian ini antibodi 8H5 akan diinteraksikan dengan masing – masing HA untuk mendapatkan epitope netralisasi hasil interaksi tersebut dan SDM digunakan sebagai modus operandi untuk menganalisis sistem secara energetik serta secara struktural akibat dinamika sistem antibodi – HA selama simulasi. Diharapkan pemahaman mengenai epitope

netralisasi yang masih bersifat awal ini dapat membantu upaya dalam menanggulangi penyebaran virus H5N1.

Studi mengenai kasus epitope netralisasi ini terdiri dari beberapa bab. Diawali dengan Bab I Pendahuluan, latar belakang terkait dengan virus H5N1, penyebaran dan penanggulangan virus H5N1, serta peran fisika dalam penanggulangan virus H5N1 dibahas. Karena fisika diaplikasikan ke dalam sistem yang bersifat biologis maka Bab II Teori Virus H5N1 dan Antibodi secara khusus membahas mengenai virus H5N1 dan antibodi yang meliputi penjelasan struktur virus dan antibodi, proses replikasi H5N1, serta interaksi antibodi dengan HA virus H5N1 dalam proses netralisasi virus sebagai modal pengetahuan dasar untuk memahami permasalahan yang dikaji. Bab III Tinjauan Pustaka memberikan informasi mengenai penelitian pendahulu yang pernah membahas interaksi antibodi dan antigen secara eksperimental dan juga secara komputasi. Tidak hanya itu penelitian tentang sistem biomolekul yang bukan tentang antibodi – antigen juga dibahas namun pembahasan lebih difokuskan mengenai metode yang digunakan dalam penelitian tersebut yang memiliki hubungan dengan penelitian ini. Dalam Bab IV Metode Penelitian dan Metode Perhitungan dibahas mengenai proses dan tahap - tahap yang dilakukan dalam penelitian dan selain itu asumsi – asumsi dasar fisis dan pendekatan teoritik yang digunakan dalam sistem yang dikaji juga diketengahkan. Hasil pengolahan data dan analisis secara komprehensif dibahas pada Bab V Hasil dan Diskusi yang dilanjutkan dengan simpulan dan juga bab penutup pada Bab VI Simpulan.

Penelitian ini berakhir dengan didapatkannya pola epitope netralisasi HA virus H5N1 asal Vietnam dan HA virus H5N1 asal Indonesia. Berdasarkan hasil yang didapatkan disimpulkan bahwa antibodi 8H5 lebih efektif untuk menetralsisir HA virus H5N1 asal Vietnam dibandingkan dengan HA virus asal Indonesia.

BAB II

TEORI VIRUS H5N1 DAN ANTIBODI

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari interaksi yang terjadi antara suatu antigen dan antibodi manusia. Antigen adalah suatu protein yang seharusnya tidak terdapat dalam tubuh, namun jika ada maka akan memicu pembentukan antibodi oleh sistem kekebalan tubuh. Di lain pihak, antibodi merupakan protein yang diproduksi oleh sistem kekebalan tubuh karena adanya substansi asing, yaitu antigen, dalam tubuh. Saat substansi asing (dapat berupa virus atau toksin) masuk ke dalam tubuh, ia akan memicu serangkaian peristiwa: anggap substansi asing yang dimaksud adalah virus influenza. Virus masuk ke dalam tubuh dan di aliran darah virus “bersentuhan” dengan sel yang mengatur sistem kekebalan tubuh. Saat sel tersebut mengenali virus sebagai substansi asing dan digolongkan sebagai antigen, sel lalu memproduksi antibodi untuk menetralkan upaya virus untuk merusak tubuh [7]. Dalam penelitian ini, interaksi yang diamati adalah netralisasi antigen oleh antibodi.

Antigen yang diamati dalam penelitian ini adalah salah satu protein utama yang terletak di permukaan virus H5N1 bernama Hemagglutinin (HA). Dalam penelitian ini upaya antibodi untuk menetralkan HA agar tidak menginfeksi sel akan diamati. Lalu pengamatan terhadap aktivitas netralisasi yang terdapat pada macam – macam HA dilakukan juga dengan menggunakan antibodi yang sama. Namun, untuk melakukan hal – hal yang telah disebutkan di atas ada baiknya beberapa prinsip virologi dijelaskan supaya pembaca mengerti fenomena biologis yang terjadi pada saat netralisasi virus dan agar pembaca lebih memahami pentingnya penelitian ini dalam iklim sekarang yang penuh dengan ketakutan terhadap pandemi flu burung.

Bab ini akan menjelaskan mengenai virus H5N1 yang meliputi struktur, siklus hidup, dan sebuah tinjauan khusus terhadap antigen utama virus H5N1, yaitu HA. Bab ini juga akan menjelaskan mengenai antibodi, aktivitas virus netralisasi, dan salah satu hal yang penting dimengerti dalam penelitian ini yaitu epitope netralisasi.

2.1 Virus H5N1

Virus H5N1 adalah virus kelas orthomyxovirus dan tergolong sebagai virus influenza tipe A. Virus H5N1 dinamakan demikian akibat sub tipe protein yang dijumpai pada permukaannya yaitu Haemaagglutinin dan Neuraminidase (NA). H5 mengacu pada sub tipe kelima dari enam belas sub tipe HA sementara N1 mengacu pada sub tipe pertama dari sembilan sub tipe NA. Secara umum H5N1 memiliki diameter sebesar 120 nm dengan permukaan virus diselimuti oleh HA, NA, dan matriks M2. [4]

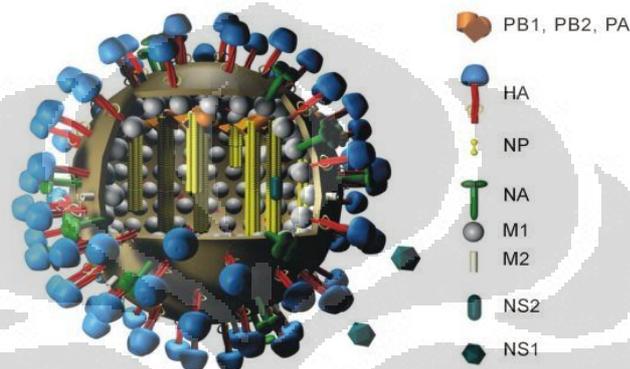
Virus H5N1 telah diisolasi dari beberapa tempat di dunia. Virus – virus yang diisolasi tersebut memiliki HA dan NA yang mirip tapi memiliki perbedaan dengan perbedaan antara virus yang diisolasi tersebut dinamakan strain. Karena perbedaan ini, sistem penamaan dikembangkan untuk membedakan virus antar strain. Penamaan lengkap virus yang telah diisolasi meliputi: tipe virus, tuan rumah (host) virus, lokasi geografik, angka serial yang menerangkan virus isolasi urutan keberapa jika mengacu pada tiga data sebelumnya, tahun isolasi, diikuti oleh varian HA dan NA yang dituliskan dalam kurung. [2,4] Sebagai contoh, jika suatu virus influenza A H5N1 diisolasi dari sebuah angsa (goose) di Guandong, Cina, pada tahun 1996 dan virus ini merupakan virus pertama yang diisolasi di daerah tersebut maka nama virus tersebut adalah A/goose/Guandong/1/1996 (H5N1).

2.1.1 Struktur Virus Influenza A H5N1

Virus influenza A (Gambar 2.1) pada umumnya merupakan virus *single strand RNA* karena material genetika dasarnya tersusun oleh RNA dengan *genome* yang terdiri dari delapan segment terpisah. Segmen – segmen tersebut disebut juga sebagai ribonucleoprotein (RNP), dan tiap segmen mengkode protein yang penting secara fungsional:

1. Protein Polymerase B2 (PB2) yang terdiri dari 759 asam amino
2. Protein Polymerase B1 (PB1) yang terdiri dari 757 asam amino
3. Protein Polymerase A (PA) yang terdiri dari 716 asam amino
4. Protein Hemagglutinin (HA atau H) yang terdiri dari 566 asam amino

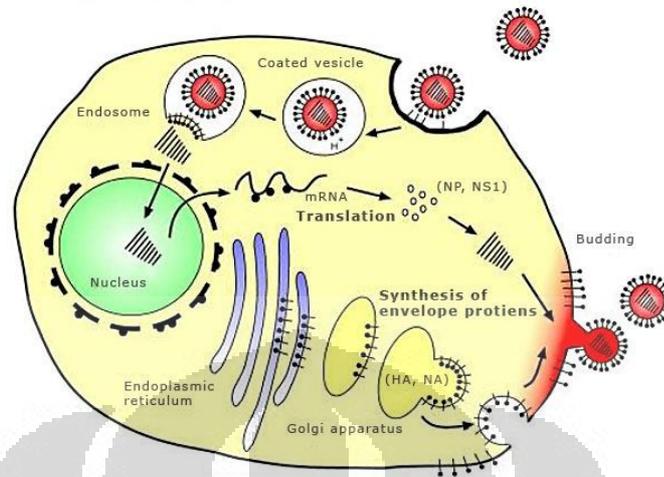
5. Protein Nucleocapsid (NP) yang terdiri dari 498 asam amino
6. Protein Neuraminidase (NA atau N) yang terdiri dari 454 asam amino
7. Protein Matrix (M) mengkode M1 dan M2 yang masing – masing terdiri dari 252 and 97 asam amino
8. Protein Non-struktural mengkode NS1 dan NS2 yang masing – masing terdiri dari 230 and 121 asam amino



Gambar 2.1 Struktur virus influenza A. 8 segmen protein – protein yang membentuk virus dapat dilihat di sebelah kanan [4].

Lapisan permukaan virus adalah membran lipid berlapis ganda dimana terdapat HA, NA, dan matriks M2. Lapisan lipid ganda tersebut menutupi M1 yang berada dalam virus. HA merupakan antigen utama virus yang memiliki fungsi untuk berikatan dengan reseptor sel tuan rumah yang berupa asam sialat dan menginduksi penetrasi virus ke dalam sel lewat fusi membran. NA juga merupakan antigen yang penting yang berfungsi sebagai enzim dengan memotong asam sialat yang berikatan dengan molekul HA. M2 berfungsi sebagai pompa ion yang bertugas untuk menurunkan dan menjaga pH setelah fusi membran terjadi. Fungsi NS1 dan NS2 dipercaya untuk memfasilitasi transpor RNP yang baru disintesis dari nukleus ke sitoplasma guna mempercepat produksi virus dalam sel yang telah terinfeksi sementara PB2, PB1, dan PA adalah protein – protein yang bertanggung jawab atas replikasi dan transkripsi RNA dalam sel yang terinfeksi [4,7].

2.1.2 Siklus Hidup Virus H5N1



Gambar 2.2 Siklus replikasi virus influenza A. Pengikatan dan pemasukan virus dilanjutkan dengan fusi membran dan pelepasan RNA viral, replikasi dalam nukleus, sintesis protein struktural, budding dan pelepasan virus [4].

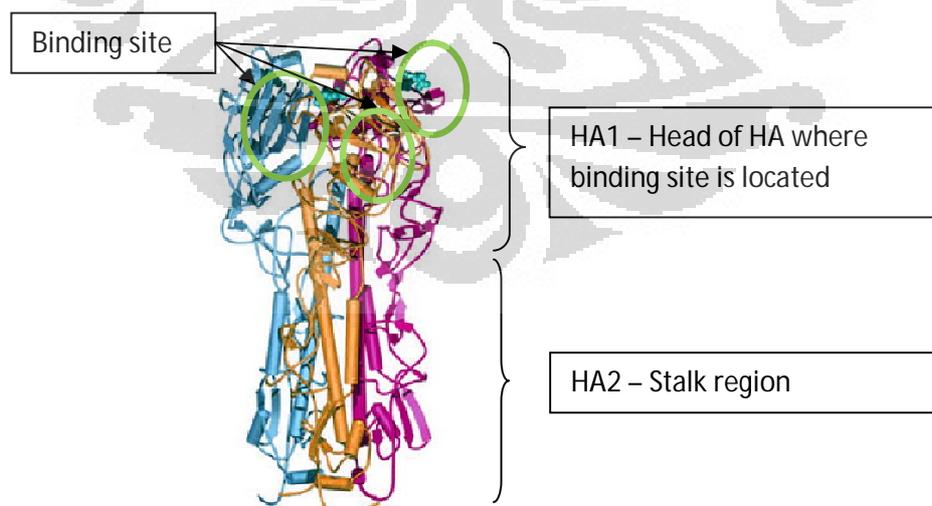
Replikasi virus H5N1 dimulai dengan adsorpsi virus oleh sel saat virus H5N1 berikatan dengan permukaan sel dengan memasang kepala HA ke asam sialat yang merupakan reseptor sel. Setelah pengikatan, virus melebur dengan sel lewat suatu proses yang dinamakan fusi membran. Pada fusi membran, HA mulai meleburkan membran sel dengan membran virus lalu matrix M2 menurunkan pH. Saat tingkat pH tertentu tercapai, penurunan pH dihentikan oleh protein M2 dan menginduksi peptida fusi HA untuk menyelesaikan fusi membran dengan membebaskan RNP ke dalam sitoplasma sel.

Setelah RNP masuk ke dalam sitoplasma, RNP lalu ditranspor ke nukleus, tempat polymerase sel berikatan dengan RNA viral untuk melakukan translasi yang meliputi pemotongan RNA viral, dan pemanjangan RNA viral. Produksi RNA viral diatur oleh NP yang membatasi sintesis RNA viral pada mRNA. Usai translasi, NP dan mRNA lalu ditranspor ke sitoplasma, dengan protein viral disintesis di ribosom. Bagian – bagian mRNA viral digabung oleh enzim seluler sehingga protein viral, seperti M1 dan NS2, terbentuk. Beberapa protein viral yang baru disintesis ditranspor ke nukleus dan mereka berikatan dengan RNA viral untuk membentuk RNP lain. Sisa protein viral yang baru disintesis lainnya diproses di *endoplasmic reticulum* dan badan Golgi untuk membentuk RNP juga.

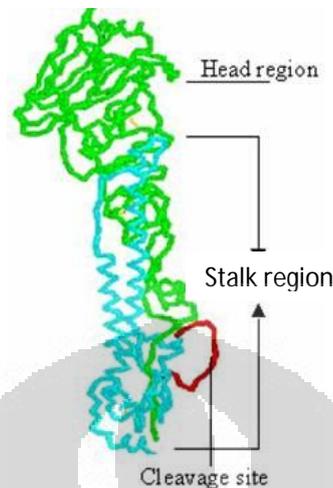
Protein – protein yang telah dibentuk kemudian ditranspor ke membran sel dimana mereka menempel pada lipid lapisan ganda. Saat konsentrasi protein viral pada membran sel mencukupi maka, RNP dan M1 mengumpul dan mengondensasi untuk membentuk partikel viral. Akhirnya partikel virus dikeluarkan dari membran sel dan dibebaskan oleh aktivitas neuraminidase untuk menjadi virus H5N1 yang baru dan utuh [4,7].

2.1.3 Hemagglutinin (HA)

Hemagglutinin (HA) merupakan antigen utama virus H5N1 dan terdapat pada permukaan virus. HA merupakan protein *homotrimeric* yang berarti bahwa satu HA terdiri dari tiga molekul identik. Gambar 2.3 memperlihatkan struktur HA. HA terdiri dari kepala HA1 dan bagian badan (stalk) yang terkubur dalam permukaan virus HA2. Penelitian Ya Ha et al. melaporkan bahwa situs antigenik berada di kepala dekat situs pengikatan [4,8]. Situs pengikatan yang dimaksud di sini adalah daerah HA yang berfungsi untuk mengikat reseptor sel. Di sisi lain, bagian badan HA mengandung daerah fusiogenik yang memiliki peran penting dalam fusi membran sementara agar HA menjadi satu kesatuan HA1 dan HA2 dihubungkan oleh suatu rantai polipeptida yang dinamakan *cleavage site* (Gambar 2.4).



Gambar 2.3 Model struktur HA. HA adalah homotrimer. Monomer – monomer dapat dibedakan berdasarkan warna. Ha terdiri dari kepala HA1 dan badan HA2. Situs pengikatan terdapat di kepala. (Diambil dari situs Protein Data Bank)

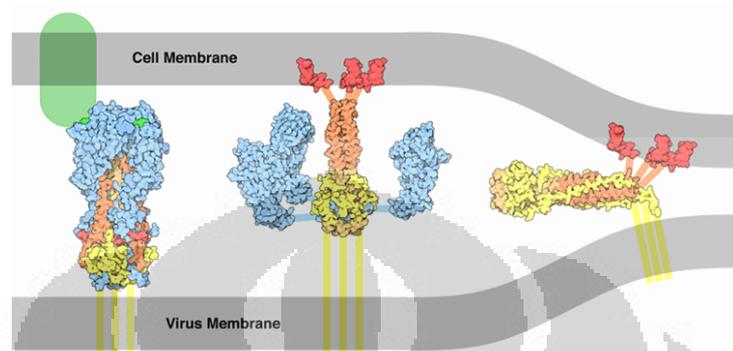


Gambar 2.4 Model struktur molekul HA. Daerah kepala berwarna hijau sementara badan berwarna biru. Kedua daerah tersebut dihubungkan dengan cleavage site, merah. (Diambil dari situs Humboldt Universitas)

Fungsi utama HA adalah untuk berikatan dengan reseptor sel dan memediasi fusi membran. Gambar 2.5 memperlihatkan proses berlangsungnya pengikatan sel dan fusi membran. HA berikatan dengan reseptor sel (yang digambarkan sebagai elips hijau) menggunakan kepala HA-1. Saat kepala telah berikatan dengan reseptor, HA membuka diri dan peptida fusi yang tadinya berada di dalam HA-2 sekarang terbuka dan menembus membran sel. HA dipotong supaya memisahkan HA-1 dan HA-2. Pemotongan tersebut dilakukan oleh protease yang dihasilkan oleh tubuh bernama trypsin. HA-2 yang memiliki peptida fusi menarik membran virus dan sel supaya mereka bersatu [10].

Salah satu alasan mengapa tingkat infeksi virus H5N1 cukup tinggi adalah karena kemampuan HA berikatan dengan sel yang akan diinfeksi cukup tinggi yang disebabkan oleh kemampuan HA untuk bermutasi secara pesat. Bila mutasi terjadi, antigen berubah bentuk sehingga antigen HA yang tadinya bisa terdeteksi sebagai ancaman bagi tubuh tidak lagi terdeteksi. Dengan demikian sistem kekebalan tubuh manusia membutuhkan waktu untuk beradaptasi dengan antigen yang baru supaya dapat membentuk antibodi yang sesuai dengan antigen tersebut. Mutasi yang pesat merupakan alasan mengapa sistem kekebalan tubuh manusia sulit untuk beradaptasi dengan flu burung sehingga terjadi penyebaran yang luar

biasa [4,8]. Mutasi ditandai dengan berubahnya asam amino pembentuk HA dengan dua tipe mutasi dapat dialami HA. Mutasi pertama dinamakan *antigenic shift*. *Antigenic shift* terjadi akibat satu sel yang terinfeksi oleh paling tidak dua virus. Keadaan ini dinamakan juga sebagai kohabitasi.



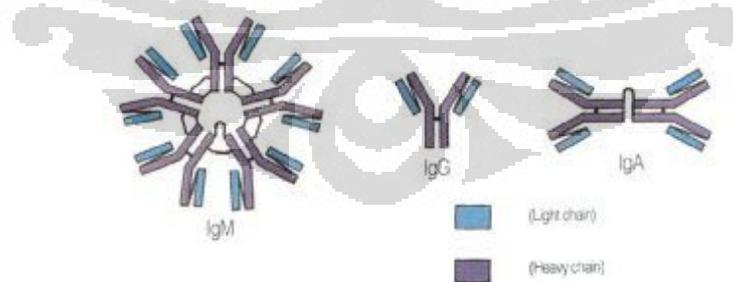
Gambar 2.5 Proses fusi membran HA dengan membran sel. Tahap pertama (kiri) kepala HA (biru) berikatan dengan reseptor sel. Tahap kedua (tengah) kepala HA membuka dan peptida fusi (merah) mempenetrasi membran sel. Tahap ketiga (kanan) pemotongan cleavage site sehingga kepala HA terputus yang dilanjutkan dengan membran virus dan membran sel semakin mendekat. (Diambil dari situs Protein Data Bank)

Pada saat replikasi untuk memproduksi virus baru, informasi genetik saling bertukar sehingga virus yang diproduksi adalah virus yang baru akibat pencampuran oleh beberapa virus. *Antigenic shift* menyebabkan suatu virus yang baru secara total sehingga virus dapat menginfeksi antar spesies. Hal ini menyebabkan H5N1 yang awalnya hanya menginfeksi burung dapat menginfeksi manusia. Mutasi tipe kedua dinamakan *antigenic drift*. Mutasi tipe ini disebabkan juga oleh kohabitasi. *Antigenic drift* terjadi karena adanya perubahan pada antigen saja akibat pertukaran informasi gen antar antigen berbeda. Dengan adanya mutasi pada antigen, sistem kekebalan tubuh harus bekerja lebih keras untuk mengenali virus sebagai ancaman bagi tubuh. Dengan demikian upaya menetralkan virus diperlambat karena antibodi yang spesifik terhadap antigen mutan tersebut harus diproduksi.

2.2 Antibodi

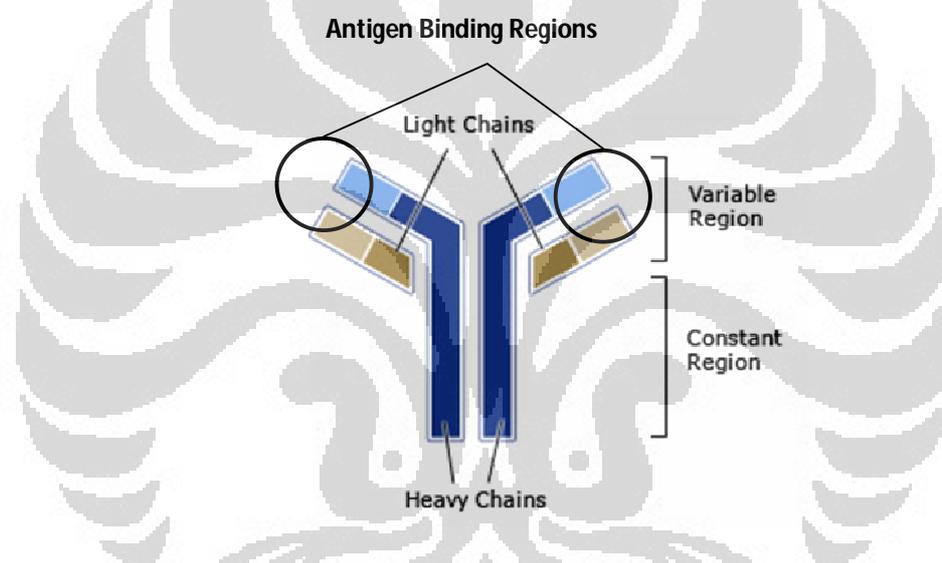
Upaya terbesar sistem kekebalan tubuh dalam menangkal infeksi virus adalah dengan memproduksi antibodi. Antibodi merupakan tipe protein yang dinamakan immunoglobulin yang diproduksi oleh sel darah putih yang bekerja

dalam sistem kekebalan tubuh bernama sel B. Sel B memiliki fungsi utama sebagai penghasil antibodi dengan adanya antigen dalam aliran darah. Setelah Sel B berinteraksi dengan antigen dan menghasilkan antibodi, sel B lalu menjadi sel B memori. Sel B memori dapat “mengingat” antigen yang mereka pernah jumpai dan jika ada antigen tersebut lagi dalam tubuh maka sel B memori dapat memproduksi immunoglobulin yang sesuai hanya dengan ingatan dan tidak perlu beradaptasi lagi. Ada beberapa macam immunoglobulin dalam tubuh manusia: immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin G (IgG), dan immunoglobulin A (IgA) (Gambar 2.6). Masing – masing immunoglobulin tersebut memiliki bentuk yang berbeda. IgM berbentuk pentamer, IgG berbentuk monomer, dan IgA berbentuk dimer [7]. Perbedaan antara antibodi – antibodi ini tidak hanya berdasarkan bentuknya saja tapi juga berdasarkan lokasi dimana mereka dijumpai dan jumlah mereka. IgA sering dijumpai di daerah *mucosa*, seperti lapisan luar mulut, tenggorokan dan paru – paru. IgM dan IgG berada dalam aliran darah dan selain perbedaan struktur, kedua antibodi berbeda dalam jumlah yang ada dalam aliran darah. IgG merupakan 75 % dari antibodi yang ditemukan dalam aliran darah dan sisanya merupakan IgM [7]. Selbihnya, saat antigen dikenal telah masuk ke dalam tubuh IgM berada pada permukaan sel B sementara IgG dilepaskan sehingga bebas mencari antigen. Dikarenakan IgG yang bergerak bebas, ia lebih dapat mencoba untuk menetralsisir virus – virus. Maka dari itu, dalam penelitian ini IgG adalah antibodi yang diamati.



Gambar 2.6 Macam – macam antibodi yang terdapat dalam tubuh manusia. IgM berbentuk pentamer, IgG berbentuk monomer, dan IgA berbentuk dimer. Bagian berwarna biru adalah rantai ‘light’ dan bagian berwarna ungu adalah rantai ‘heavy’.
(Diambil dari situs Maricopa Education)

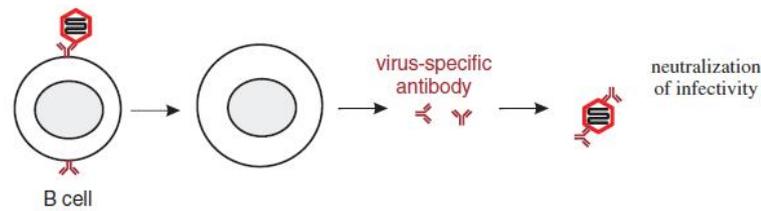
IgG merupakan monomer yang terdiri dari dua rantai polipeptida, yaitu rantai *light* dan rantai *heavy*, yang saling terikat oleh ikatan disulfida. Selain terdiri dari dua rantai, ada dua daerah berbeda di masing – masing rantai. Daerah yang dimaksud adalah daerah konstan dan daerah variabel . Perbedaan antara kedua daerah dapat dibedakan dengan merujuk ke Gambar 2.7. Daerah konstan dinamakan demikian karena untuk semua IgG, asam amino pembentuk daerah tersebut sama. Sementara daerah variabel dinamakan demikian karena struktur dan asam amino penyusun tergantung pada antigen yang ingin dinetralisasi. Pada daerah variabel terdapat daerah pengikatan antigen yang spesifik terhadap satu anten [7,8].



Gambar 2.7 Struktur umum antibodi IgG. Antibodi terdiri dari dua rantai; rantai heavy (biru) dan rantai light (coklat). Kedua rantai ini dibagi lagi menjadi dua daerah pada masing – masing rantai, yaitu daerah konstan dan variabel. Daerah yang dapat berikatan dengan antigen ada di daerah variabel [7].

2.3 Interaksi Antibodi dan Antigen dalam Netralisasi Virus

Sejauh ini BAB II telah menerangkan mengenai antigen HA dan antibodi. Dalam subbab ini, interaksi antibodi dan antigen dalam proses netralisasi virus akan dijelaskan.



Gambar 2.8 Netralisasi virus oleh antibodi. Antibodi – antibodi yang antigen–spesifik dikeluarkan oleh sel B yang mengenal antigen virus. Antibodi lalu berikatan dengan virus dan menetralsir upaya virus untuk menginfeksi [7].

Awal mula proses netralisasi virus mulai dengan virus yang masuk ke dalam aliran darah. Dalam aliran darah, virus dapat merangsang sel B dengan berikatan dengan sel B. Saat sel B mengenali virus sebagai antigen maka sel B memproduksi antibodi yang khusus untuk antigen tersebut dengan “mencetak” daerah variabel antibodi supaya dapat cocok dengan antigen. Antibodi - antibodi yang diproduksi lalu dikeluarkan dari sel B untuk mencari dan menetralsir antigen – antigen yang berada dalam tubuh. Antigen utama virus H5N1 merupakan HA, sehingga antibodi – antibodi berupaya untuk berikatan dengan HA. HA memiliki fungsi untuk berikatan dengan sel. Jika HA dihalangi oleh antibodi maka virus tidak dapat menggunakan HA untuk berikatan dengan sel. Penghalangan antigen oleh antibodi dinamakan *steric hindrance*. *Steric* berarti ruang dan *hindrance* berarti penghalangan. Jika *steric hindrance* terjadi pada satu virus, virus tersebut tidak dapat menginfeksi suatu sel sehingga virus yang tertutupi oleh antibodi disebut sebagai ternetralsir.

Penjelasan singkat di atas dapat memberi gambaran mengenai mekanisme netralisasi virus. Salah satu langkah utama dalam netralisasi virus adalah pengikatan antibodi dengan antigen yang kemudian menghasilkan *steric hindrance*. *Steric hindrance* terjadi akibat antigen yang dihalangi oleh antibodi. Bagian antigen yang berinteraksi langsung dengan antibodi sehingga mempromosikan *steric hindrance* dinamakan epitope netralisasi.

Walaupun antigen HA mengalami mutasi secara pesat, epitope netralisasi HA terkonservasi untuk beberapa strain virus H5N1. Epitope netralisasi HA telah

diamati pada dua lokasi. Lokasi pertama ada pada daerah kepala HA dekat situs pengikatan reseptor [8]. Daerah kedua ada pada daerah badan HA di dekat *cleavage site* [8]. Pentingnya kedua lokasi ini akan dijelaskan. Lokasi pertama ada pada daerah kepala dekat situs pengikatan reseptor yang seharusnya berikatan dengan reseptor sel. Jika daerah ini dihalangi maka virus tidak dapat berikatan dengan sel. Lokasi kedua adalah daerah badan dekat *cleavage site*. Seandainya HA berikatan dengan reseptor sel, maka langkah alamiah yang dilakukan adalah fusi membran saat HA1 dan HA2 berpisah lewat pemotongan *cleavage site*. Jika bagian tersebut dihalangi oleh antibodi, HA tetap berikatan dengan sel namun tidak dapat melakukan fusi membran dan virus tetap saja tidak dapat menginfeksi sel sehingga virus H5N1 tersebut dapat dikatakan ternetralisasi.

Signifikansi epitope netralisasi ada pada pembuatan vaksin. Vaksin dibuat dari virus – virus yang disterilkan. Virus disterilkan dengan mengambil beberapa gen virus yang destruktif sehingga virus tidak dapat menginfeksi sel. Jika ada suatu epitope netralisasi yang bersifat umum antara strain virus H5N1 yang berbeda maka vaksin akan didasarkan atas informasi tersebut. Saat vaksin dimasukkan ke dalam tubuh, virus – virus yang steril akan merangsang sel B dalam pembentukan antibodi yang dapat bekerja terhadap epitope netralisasi yang bersifat umum tersebut. Jika virus H5N1 yang berbeda strain terdapat dalam tubuh dan memiliki epitope netralisasi yang umum maka antibodi dapat menetralsisir virus – virus yang berbeda strain tersebut. Jika ada epitope netralisasi yang umum dapat ditentukan untuk semua mutan virus H5N1, maka pengembangan vaksin universal dapat dilakukan.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini akan membahas tulisan – tulisan terdokumentasi yang membahas hal – hal berhubungan dengan penelitian ini. Dengan membahas penelitian pendahulu diharapkan kerangka kerja penelitian ini dapat dibayangkan serta dipahami. Salah satu masalah utama mengenai penelitian pendahulu mengenai interaksi antibodi dan virus H5N1 merupakan kurangnya jumlah penelitian yang terdokumentasi dan diperuntukkan untuk khalayak umum. Sehingga untuk meninjau penelitian pendahulu mengenai interaksi antigen – antibodi, bab ini akan mendiskusikan penelitian yang telah dilakukan secara eksperimen juga penelitian yang dikerjakan secara komputasi dengan penerapan pemodelan struktur molekul dan simulasi dinamika molekuler merupakan hal yang integral. Beberapa penelitian yang bersifat komputasi dalam bab ini tidak berhubungan dengan interaksi antibodi-antigen, namun tetap didiskusikan karena metode – metode yang digunakan merupakan metode - metode yang berhubungan erat dengan penelitian ini.

Dua penelitian awal yang akan dibahas merupakan penelitian mengenai interaksi antigen – antibodi lewat pendekatan eksperimental. Penelitian pertama yang akan dibahas merupakan penelitian yang dilakukan oleh Lim et al. yang berjudul *Epitope characterization of the protective monoclonal antibody VN04-2 shows broadly neutralizing against highly pathogenic H5N1* [9]. Dalam publikasi ini, suatu antibodi monoklonal yang dinamakan sebagai VN04-2 dikultur dalam laboratorium lalu diintroduksi kepada sembilan strain HA berbeda. HA yang digunakan terdiri dari dua HA asal Vietnam, tiga asal Indonesia, dan lainnya asal isolasi di Qing Hai, Ivory Coast, Zhe Jiang, dan Guang Zhou. VN04-2 dikultur untuk melawan salah satu strain HA dari Vietnam sehingga pemilihan HA yang digunakan dalam eksperimen berdasarkan HA dengan struktur dan sekuens asam amino yang mirip dengan HA Vietnam tersebut.

Dalam eksperimen, masing – masing HA diinkubasi dengan VN04-2 lalu dibiarkan selama tiga hari supaya inhibisi hemagglutinin dapat berlangsung. Setelah tiga hari berlalu, tiap spesimen lalu diuji dengan ELISA test, dimana enzim horseradish peroxidase (HRP) dilarutkan ke dalam tiap subyek sehingga dapat berinteraksi dengan antibodi. Setelah HRP berinteraksi dengan antibodi, sampel tersebut lalu disinari dengan cahaya sehingga sampel dapat bersinar secara fluoresen. HRP digunakan untuk merangsang terjadinya fluoresens. Intensitas dari emisi fluoresens tersebut lalu diterima oleh detektor sehingga absorbansi

sampel dapat diukur. Jika absorbansi rendah maka antibodi dominan dalam jumlah dibandingkan antigen dan dapat menetralkan virus.

Hasil ELISA test menunjukkan bahwa inhibisi terhadap hemagglutinin terjadi untuk semua subyek kecuali dengan dua strain antigen yang berasal dari Indonesia. Absorbansi kedua sampel sangat tinggi dibandingkan dengan HA yang lain sehingga dapat dikatakan bahwa kedua antigen asal Indonesia tersebut resisten terhadap VN04-2. Satu hal yang menarik dari publikasi ini merupakan pembahasan mengenai keefektifan uji inhibisi hemagglutinin seperti ELISA test. Lim et al. menyatakan bahwa akurasi uji inhibisi hemagglutinin mungkin tidak dapat diandalkan sepenuhnya berdasarkan jumlah VN04-2 yang terdapat dalam sampel dibandingkan aktivitas netralisasi yang dilakukan.

Berdasarkan argumen yang dikemukakan di atas, maka pemodelan secara komputasi yang dapat fokus kepada interaksi residu asam amino pembentuk molekul memiliki kegunaan yang signifikan sehingga dapat menjelaskan penemuan – penemuan eksperimen secara mendalam. Penelitian kedua yang dapat menyokong pernyataan pada kalimat sebelumnya merupakan penelitian yang dilakukan oleh Yoshinobu et al. yang berjudul *A Common Neutralizing Epitope Conserved between the Haemagglutinins Influenza Virus A H1 and H2 Strains* [10]. Penelitian berawal dengan didapatkannya antibodi yang dinamakan C179 saat seekor tikus diimunisasi dengan virus influenza H2N2. Antibodi C179 lalu dikultur dan diintroduksi ke virus subtipe H1, H2, dan H3.

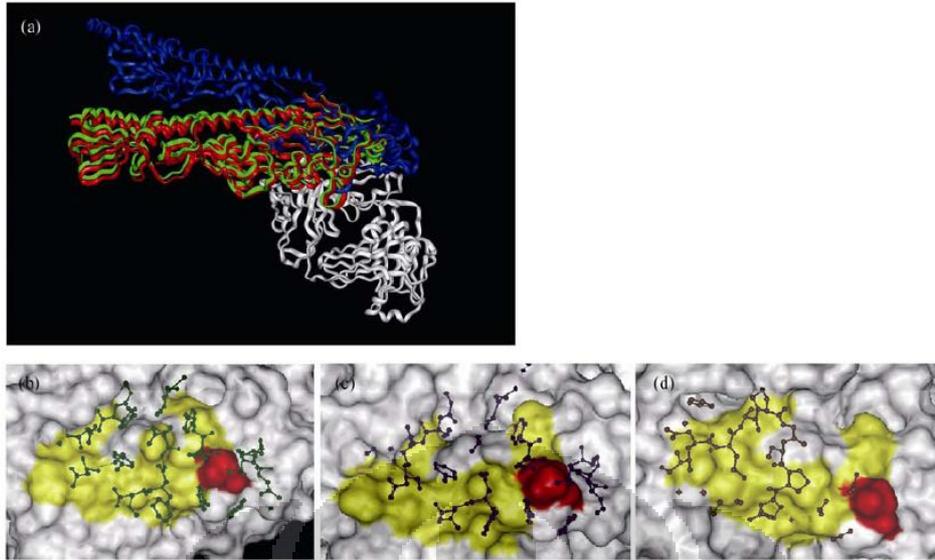
Netralisasi ketiga virus dengan subtipe HA berbeda tersebut diuji dengan menggunakan *immunoprecipitation assay* dengan kertas kromatografi yang digunakan untuk mengendapkan protein antigen yang telah berikatan dengan antibodi. Saat ketiga subtipe HA diuji dengan *immunoprecipitation* menggunakan antibodi C179, hasil yang dicapai adalah subtipe H1 dan H2 ternetralkan sementara subtipe H3 tidak. H1 dan H2 yang ternetralkan lalu dipindai untuk mengetahui sekuens asam amino dan didapatkan bahwa ada epitope netralisasi yang umum pada kedua subtipe HA. Epitope netralisasi yang umum tersebut terletak pada residu asam amino nomor 318-322 pada daerah HA1 dan residu asam amino nomor 47 – 58 pada daerah HA2. *Immunoprecipitation* mengindikasikan adanya aktivitas netralisasi yang dapat diamati tetapi berbeda saat uji inhibisi hemagglutinin dilakukan. Hasil uji inhibisi hemagglutinin menunjukkan bahwa tidak ada inhibisi hemagglutinin oleh antibodi. Hal ini bertolak belakang dengan hasil *immunoprecipitation* karena netralisasi suatu antigen harusnya berawal dari inhibisi antigen.

Masalah seperti di atas dapat diatasi dengan menggunakan pemodelan komputasi sehingga mungkin hasil yang bertolak belakang tersebut dapat diteliti. Salah satu masalah yang juga dikemukakan oleh Yoshinobu et al. merupakan ketidakmampuan eksperimen untuk mengamati daerah pengikatan HA dengan C179. Namun dengan menggunakan pemodelan komputasi, asam amino HA yang berikatan dengan antibodi dapat diperkirakan dan diamati.

Sejauh ini, penelitian – penelitan yang telah dibahas merupakan penelitian yang berdasarkan pendekatan eksperimental sedangkan kini penelitian yang akan dibahas berhubungan erat dengan ilmu fisika, yaitu penggunaan komputasi untuk mempelajari kompleks biomolekuler. Salah satu penelitan yang mempelajari interaksi antibodi-antigen merupakan penelitian yang dilakukan oleh Yan et al. (2008). Penelitian mereka yang berjudul *Prediction of a common neutralizing epitope of H5N1 avian influenza virus by in silico molecular docking* [11] memiliki tujuan untuk memprediksi *epitope netralisasi* umum dari tiga molekul HA strain virus H5N1 yang berbeda dengan melakukan *molecular docking* terhadap antibodi yang dinamakan 8H5.

Antibodi 8H5 dikultur di the Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Cina dan sekuens asam amino dipindai di BoYa Co. Shanghai, Cina. 8H5 digunakan dalam penelitian ini karena secara eksperimen, 8H5 sukses menetralsir 46 virus strain berbeda. Berdasarkan sekuens yang dihasilkan oleh BoYa Co., Yan et al. lalu melanjutkan untuk memodelkan struktur 8H5 secara komputasi lewat *homology modeling* karena antibodi yang dipindai hanya dipindai untuk sekuensnya bukan struktur tiga dimensinya, tidak seperti model – model HA yang sudah memiliki struktur 3D yang dapat diakses lewat Protein Data Bank (PDB). Model antibodi yang digenerasikan diverifikasi menggunakan analisis energi, analisis *solvent accessible surface*, dan analisis Profile 3-D.

Antigen yang digunakan dalam penelitian merupakan HA yang berasal dari dua strain (dengan PDB *acesion code* 2IBX dan 2FK0) Vietnam dan satu asal Singapura (1JSM). Masing- masing HA berasal dari manusia kecuali untuk salah satu HA Vietnam (2FK0), yang merupakan burung. Struktur tersebut lalu melalui proses minimisasi dengan menggunakan medan gaya *consistent valence force field* agar struktur optimal. Model – model yang telah dimininisasi lalu digabungkan dengan 8H5 lewat *molecular docking* untuk membentuk kompleks 8H5-HA.

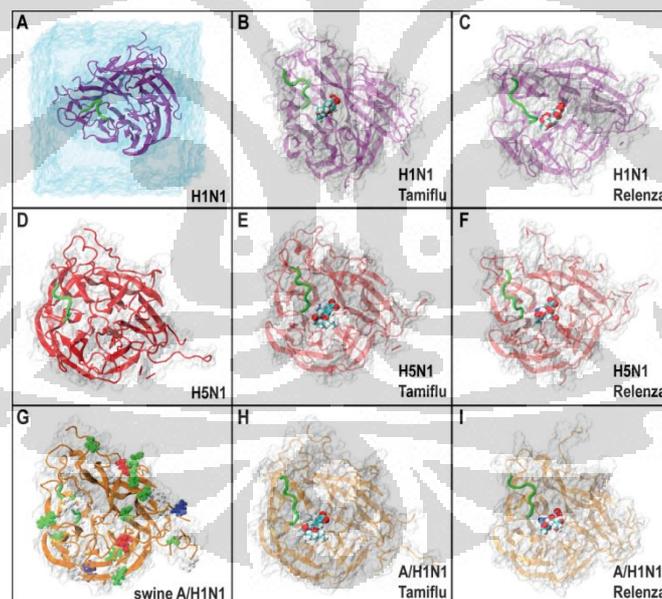


Gambar 3.1 (a) Posisi hasil docking masing – masing HA dengan 8H5 yang disuperposisi. 8H5 berwarna putih , HA manusia Singapura berwarna merah, HA manusia Vietnam berwarna hijau, dan HA burung Vietnam berwarna biru. (b) menunjukkan pola pengikatan HA manusia Singapura dengan 8H5. (c) menunjukkan pola pengikatan HA manusia Vietnam dengan 8H5. (d) menunjukkan pola pengikatan HA burung Vietnam dengan 8H5 [11].

Hasil docking mengindikasikan bahwa ada epitope netralisasi umum untuk ketiga HA. Masing – masing HA juga menunjukkan adanya pola pengikatan 8H5 yang serupa walaupun asal organisme HA berbeda spesies (Gambar 3.1).

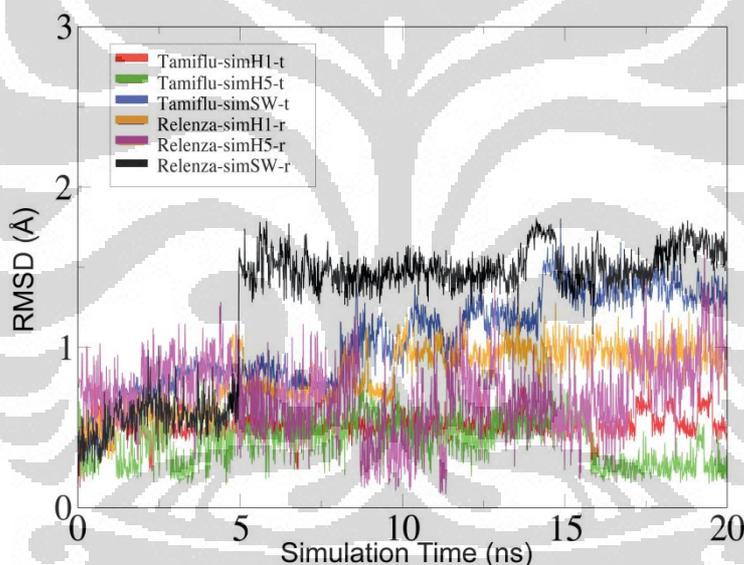
Tugas akhir ini sangat terpengaruhi oleh penelitian Yan et al. mulai dari penggunaan HA dan antibodi 8H5 hingga penggunaan *molecular docking* untuk memprediksi epitope netralisasi sebagai langkah awal dalam mengamati aktivitas epitope netralisasi. Satu hal yang perlu digaris bawahi merupakan kata – kata langkah awal karena langkah akhir berupa *molecular docking* dalam penelitian Yan et al. adalah langkah awal untuk penulis. Alasan mengapa demikian adalah karena *molecular docking* secara umum dapat memprediksi posisi pengikatan yang dapat terjadi secara baik dalam keadaan diam. Pengikatan antar molekul dalam keadaan diam dapat divisualisasi dengan baik menggunakan *molecular docking* tapi pada kenyataannya biomolekul tidak selalu dalam keadaan yang diam sehingga perlu pendekatan yang dapat menggambarkan interaksi antar molekul yang dinamis secara ekstensif yakni dengan mengimplementasikan simulasi dinamika molekuler. Penelitian selanjutnya yang akan dibahas adalah penelitian yang menggunakan simulasi dinamika molekuler untuk mempelajari suatu sistem biomolekuler. Subyek yang dipelajari sendiri memang bukan mengenai interaksi antibodi-antigen tetapi fokus pembahasan lebih mengenai aplikasi ilmu fisika dalam pemodelan biomolekuler lewat simulasi dinamika molekuler.

Satu publikasi yang menggunakan dinamika molekuler dalam mempelajari kompleks biomolekuler dilakukan oleh Schulten et al. (2009). Dalam publikasi mereka yang berjudul *Molecular modeling of swine influenza A/H1N1, Spanish H1N1, and avian H5N1 flu NA neuraminidases bound to Tamiflu and Relenza* [12], Schulten et al. mencoba untuk mengkonfirmasi stabilitas NA dari virus H5N1 dan H1N1 yang membentuk kompleks dengan obat – obat komersil, Tamiflu dan Relenza. Dalam preparasi simulasi dinamika molekuler, tiga NA dimodelkan dengan adanya obat dan tidak ada obat (Gambar 3.2) dan secara keseluruhan ada sembilan model. Untuk minimisasi dan simulasi dinamika molekuler medan gaya CharmM (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics) diaplikasikan ke tiap sistem. Minimisasi dilakukan dengan 1000 langkah dan khusus untuk molekul obat minimisasi energi digunakan dengan mengaplikasikan Hartree Fock agar struktur elektronik obat juga optimal. Setelah struktur optimal didapatkan lalu simulasi dinamika molekuler dilakukan pada temperatur konstan 300 K, waktu simulasi 20 ns pada keadaan setimbang, dan dengan tiap sistem dilarutkan dalam kotak air.



Gambar 3.2 Tabel yang mengilustrasikan sembilan sistem yang disimulasi. Sistem yang disimulasikan meliputi NA dari 1918 Spanish flu H1N1, Burung H5N1, dan Babi A/H1N1. Dalam A) protein H1N1 digambarkan berada dalam kotak air, konstruksi yang sama diterapkan pada kesembilan simulasi protein. Dalam A-C), H1N1 digambarkan secara berurutan dengan tidak ada obat yang berikatan, Tamiflu berikatan, dan Relenza berikatan. Hal yang sama ditunjukkan oleh D-F dan G-I untuk NA H5N1 dan A/H1N1. Dalam G), residu – residu A/H1N1 yang berbeda dengan H5N1 ditunjukkan untuk menandakan mutasi pada sistem yang akan disimulasikan [12].

Hasil simulasi menunjukkan stabilitas yang terjaga untuk tiap sistem dengan kompleks H5N1 – Tamiflu sebagai kompleks yang paling stabil. Stabilitas digambarkan dengan grafik RMSD (*Root mean square deviation*) terhadap waktu (Gambar 3.3). RMSD menggambarkan deviasi rata-rata posisi obat dari posisi awalnya. Selain analisis RMSD, Schulten et al. juga mengidentifikasi ikatan – ikatan hidrogen terkonservasi dalam yang mempromosikan kestabilan struktur tiap model. Mutasi yang terjadi pada beberapa residu dapat menghasilkan perubahan ikatan hidrogen yang dapat menyebabkan ketidakstabilan kompleks NA-obat. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa mutasi yang dilaporkan terjadi di beberapa tempat tidak menyebabkan ketidakstabilan sistem karena ikatan hidrogen tetap terbentuk akibat pengikatan dengan residu asam amino tetangga.



Gambar 3.3 Obat Tamiflu and Relenza berikatan secara stabil dengan H1N1, H5N1, and H1N1A. Yang ditunjukkan merupakan root mean squared deviations (RMSD) dari obat untuk tiap simulasi. Nilai yang tertera menunjukkan posisi obat yang cenderung konstan dengan deviasi minimum pada situs pengikatan, sehingga memperbolehkan karakterisasi interaksi spesifik obat-protein yang bertanggung jawab atas pengikatan Tamiflu dan Relenza yang kuat pada situs aktif NA tipe I [12].

Implementasi simulasi dinamika molekuler oleh Schulten et al. sangat penting untuk penelitian penulis karena simulasi dinamika molekuler merupakan prosedur yang diperlukan setelah *molecular docking* untuk mengamati stabilitas sistem. Pendekatan yang serupa dengan Schulten et al. juga dilakukan dalam penelitian ini, dari penggunaan medan gaya CharmM hingga temperatur simulasi 300 K. Waktu simulasi yang ditentukan penulis berbeda

dengan Schulten et al. Nampaknya penentuan waktu simulasi belum ada suatu standar karena banyak publikasi yang menggunakan simulasi dinamika molekuler menggunakan waktu yang berbeda, dari 210 ps [13], 3 ns [14], hingga 20 ns seperti pada penelitian Schulten et al. Salah satu perbedaan antara tugas akhir ini dengan penelitian Schulten et al. adalah pada hasil yang dianalisis. Tugas akhir ini akan menganalisis RMSD terhadap waktu dan energi sistem terhadap waktu berkenaan dengan sistem yang diamati adalah kompleks antibodi-antigen dengan situs pengikatan belum dapat terbilang terkonservasi dan sama untuk HA yang membentuk kompleks dengan suatu antibodi. Berhubungan dengan pengikatan, ikatan hidrogen dilaporkan memiliki peran penting dalam publikasi Schulten et al. sehingga penulis juga akan mengamati ikatan hidrogen yang terbentuk antara HA dan antibodi.



BAB IV

METODE PENELITIAN

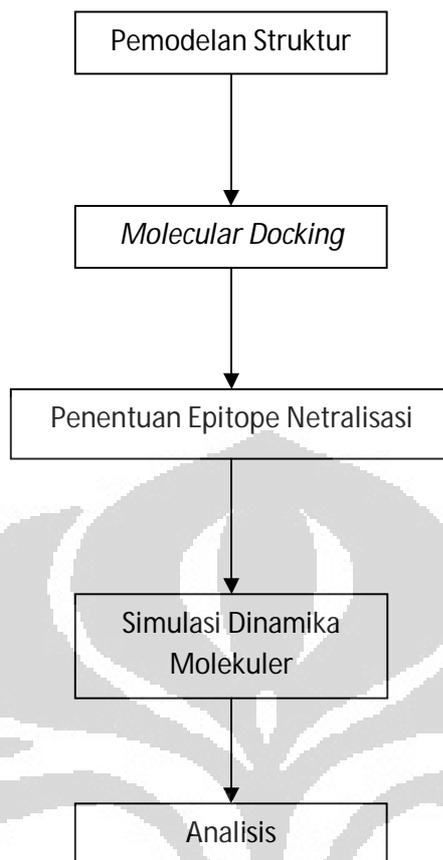
&

METODE PERHITUNGAN

Dalam bab ini akan dijelaskan mengenai dua hal yang signifikan dalam penelitian ini. Hal pertama yang akan dibahas adalah metode penelitian yakni tahap, proses, dan teknik analisis dalam penelitian dijelaskan. Hal kedua yang tidak kalah pentingnya adalah metode perhitungan dalam penelitian ini. Bagian ini akan menjelaskan konsep – konsep fisika yang akan digunakan dalam perhitungan serta pendekatan teoritik apa saja yang diaplikasikan untuk menjelaskan suatu keadaan sistem.

4.1 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari lima tahap. Tahap pertama adalah pemodelan struktur molekul. Pemodelan struktur molekul berfungsi untuk menggenerasikan struktur 3D molekul protein (HA dan antibodi) yang akan diteliti. Tahap kedua adalah *molecular docking* yang dilakukan untuk menginteraksikan molekul HA dengan molekul antibodi supaya membentuk kompleks antibodi–HA. Dengan melakukan *molecular docking* maka epitope netralisasi bisa diamati dan tahap keempat bisa dilakukan, yakni penentuan epitope netralisasi. Tahap selanjutnya adalah simulasi dinamika molekuler (SDM) guna mengamati kestabilan dan perubahan yang mungkin terjadi pada epitope netralisasi serta struktur global kompleks antibodi-HA. Setelah SDM dilakukan maka analisis terhadap sistem bisa dilakukan. Analisis yang dilakukan mencakupi perubahan yang mungkin dialami sistem selama simulasi serta dampak biologis yang dapat terjadi.



Gambar 4.1 Bagan alur penelitian

4.1.1 Pemodelan Struktur Molekul

Model secara esensial adalah suatu cara sederhana untuk menggambarkan dan memprediksi suatu hal yang bersifat ilmiah. Model bisa berupa persamaan matematis atau suatu visualisasi yang bersifat non-matematis. Dalam mempelajari suatu interaksi yang terjadi pada sistem biomolekuler, model struktur tiga dimensi (3D) molekul merupakan suatu hal yang sangat signifikan karena simulasi yang akan dilakukan adalah terhadap model struktur 3D tersebut.

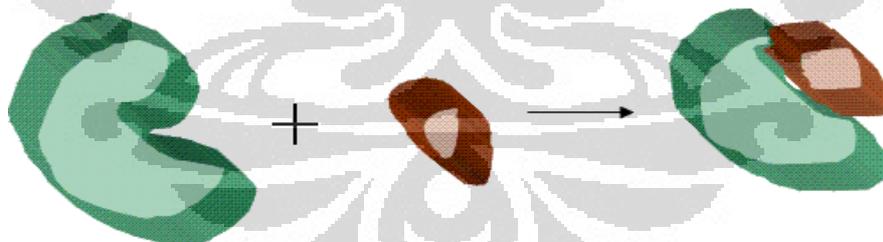
Struktur 3D molekul protein bisa didapatkan lewat dua cara, yaitu pertama secara eksperimental dengan XRD atau NMR dan kedua dengan teknik yang dinamakan *homology modeling*, yang murni berbasis komputer. Metodologi *homology modeling* berdasarkan kepada pengertian mengenai evolusi protein. Protein - protein yang memiliki sekuens asama amino serupa biasanya memiliki struktur yang serupa. Sehingga dalam pemodelan struktur, jika kita memiliki suatu sekuens asam amino yang belum mempunyai struktur 3D, sekuens 'mentah' tersebut akan dibandingkan dengan sekuens yang memiliki struktur 3D dalam

database dan struktur 3D dengan sekuens paling mirip dengan sekuens ‘mentah’ tersebut akan dijadikan template lalu dimodifikasi dengan cara mengganti asam amino yang berbeda untuk mendapatkan struktur 3D yang diinginkan.[15,16] Dengan demikian naiknya akumulasi struktur 3D hasil eksperimen seiring majunya teknologi identifikasi homologi menyebabkan *homology modeling* menjadi suatu teknik yang sangat menguntungkan dalam memahami interaksi biomolekul.

4.1.2 *Molecular Docking*

Memahami interaksi antar protein sangat esensial dalam memahami proses biologis. Satu teknik yang telah dikembangkan secara komputasional guna memahami interaksi protein adalah *molecular docking*.

Molecular docking, atau lebih khususnya protein – protein docking, adalah suatu proses dengan komponen protein yang terpisah dirakit sedemikian rupa sehingga menjadi kompleks protein yang menyatu menggunakan metode komputasi. Metode ini diawali dengan struktur tiga dimensi (3D) komponen individu yang dikategorikan ke dalam dua kelompok yaitu protein ligand dan protein reseptor. Fungsi protein ligand adalah untuk mencari posisi yang terbaik untuk berikatan dengan protein reseptor yang diam.[17,32] Penggabungan reseptor dan ligand bersifat prediksi yang ilmiah sehingga dapat digunakan untuk membantu peneliti – peneliti memahami fungsi seluler serta membangun pendekatan rasional dalam desain obat dan vaksin.



Gambar 4.2 Diagram skematik proses molecular docking. Reseptor (hijau) dan (ligand) yang awalnya terpisah bergabung membentuk kompleks.(Diambil dari situs Arvind Ramanathan)

Dalam penelitian ini molecular docking dilakukan dengan modul ZDOCKpro dalam piranti lunak Discovery Studio 2.1. ZDOCKpro dapat membentuk satu kompleks molekul dari dua struktur molekul yang terpisah dengan dua tahap docking:

- ZDOCK, yaitu proses penggabungan struktur molekul menjadi satu kompleks, dan
- RDOCK, yaitu proses *refinement* kompleks yang dihasilkan ZDOCK.

ZDOCK menggabungkan struktur yang terpisah dengan menggunakan metode pencarian yang bernama Pairwise Shape Complimentary (PSC), dengan menentukan posisi terbaik protein – protein untuk berikatan berdasarkan kurvatur permukaan masing – masing protein. Satu hal yang menjadi masalah dalam PSC adalah pengabaian interaksi atomik yang dapat terjadi pada daerah interaksi protein. Pengabaian tersebut menyebabkan adanya atom – atom yang menghimpit dan bertabrakan (*steric clashes*). Oleh karena itu RDOCK digunakan untuk memperbaiki *steric clashes* yang terjadi akibat ZDOCK dengan mengoptimalkan struktur dengan proses minimisasi energi yang dilakukan terhadap sistem.

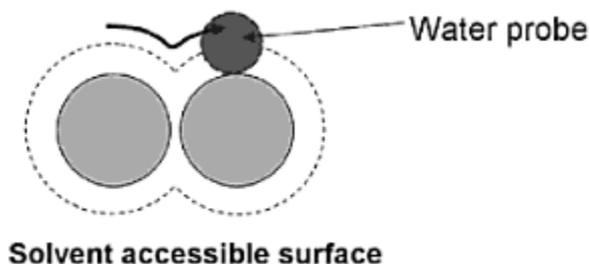
Dalam penelitian ini molecular docking dilakukan terhadap struktur molekul antibodi dengan struktur molekul HA. Dengan demikian kompleks antibodi - HA dapat digenerasikan dan interaksi berupa pembentukan epitope netralisasi dapat diamati.

4.1.3 Penentuan Epitope Netralisasi

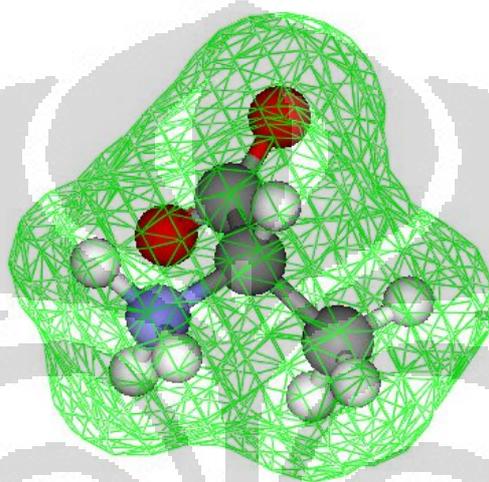
Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengamati epitope netralisasi yang dibentuk oleh interaksi antara HA dan antibodi. Epitope netralisasi sendiri dapat ditentukan oleh pengamatan terhadap dua hal pada kompleks antibodi – HA, yaitu *solvent accessible surface* (SAS) dan ikatan hidrogen pada daerah interaksi antibodi – HA.

1. *Solvent Accesible Surface* (SAS)

Penilaian struktural suatu proses biologis dapat dilakukan dengan pengamatan terhadap sesuatu yang dinamakan permukaan molekul protein. Permukaan molekul protein dapat divisualisasikan dengan bermacam cara. Salah satu cara yang sering digunakan dalam studi mengenai interaksi antar biomolekul dan interaksi obat dengan biomolekul adalah dengan mengamati *solvent accesible surface* (SAS). SAS merupakan visualisasi permukaan molekul protein dengan atom – atom penyusun dianggap sebagai bola – bola dengan radius bola tersebut adalah radius van der Waals dari suatu atom. Penggambaran SAS lalu dilakukan dengan cara “menggelindingkan” suatu *probe sphere*, yang seukuran dengan molekul air, di atas permukaan van der Waals atom – atom sehingga lintasan yang dilalui oleh pusat *probe sphere* tersebut adalah permukaan molekul yang bisa berinteraksi dengan suatu pelarut (*solvent*) [15,18].



Gambar 4.3 Proses penggambaran SAS oleh probe sphere [18].



Gambar 4.4 SAS (jaring hijau) dari asam amino Alanin. Atom karbon berwarna abu – abu, atom nitrogen berwarna biru, atom oksigen berwarna merah, dan atom hidrogen berwarna putih.

2. Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen adalah ikatan intermolekuler antara atom hidrogen dengan suatu atom yang elektronegatif, seperti oksigen, nitrogen, dan fluorin. Peran ikatan hidrogen sangat signifikan pada struktur protein sebab stabilitas struktur suatu protein dipengaruhi ikatan hidrogen [19]. Ikatan hidrogen dalam penelitian ini diamati karena satu – satunya ikatan yang terjadi antara antibodi dan antigen HA merupakan ikatan hidrogen

4.2 Metode Perhitungan

4.2.1 Mekanika Kuantum – Density Functional Theory

Keadaan suatu sistem yang terdiri dari M atom dan N elektron dapat direpresentasikan dengan persamaan Schrödinger[20]:

$$H\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Dengan H menyatakan operator Hamiltonian yang terdiri dari komponen energi kinetik dan potensial:

$$H = U + T + V_{ee} \quad (2)$$

Potensial eksternal, U , dihasilkan dari interaksi elektron dengan inti atom:

$$U = - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} \quad (3)$$

T merupakan operator energi kinetik elektron:

$$T = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 \quad (4)$$

V_{ee} adalah operator interaksi antar-elektron:

$$V_{ee} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|r_i - r_j|} \quad (5)$$

Ψ menyatakan persamaan gelombang elektron yang secara umum dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\Psi = \Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (6)$$

Dengan Ψ berhubungan langsung dengan eigenvalue E . Perhitungan tingkat atomik seperti ini tidak bisa dipraktikkan pada simulasi dinamika molekuler di penelitian ini, namun mekanika kuantum diimplementasikan pada optimalisasi struktur epitope netralisasi setelah molecular docking untuk mendapatkan struktur elektronik yang baik sebelum melakukan simulasi dinamika molekuler.

Persamaan Schrödinger bisa menggambarkan suatu sistem dengan tingkat akurasi yang tinggi namun mencari solusi persamaan Schrödinger untuk sistem yang skalanya sebesar makromolekul sangat sulit dan memakan waktu komputasi yang lama. Density Functional Theory (DFT) diintroduksi (awalnya digunakan untuk pemodelan material padat) untuk menangani masalah ini. Premis dasar DFT adalah energi suatu sistem berkorelasi langsung dengan densitas elektronik. Berdasarkan hal demikian Kohn dan Sham lalu memformulasikan persamaan berikut [6,19,20]:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = \int V_{\text{ext}}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} + E_T[\rho(\mathbf{r})] \quad (7)$$

Energi E merupakan suatu fungsional densitas. V_{ext} adalah energi interaksi elektron dengan inti atom sebagai fungsi densitas elektron pada keadaan dasar, E_T adalah energi kinetik total elektron yang terdiri dari energi kinetik elektron, energi interaksi antar elektron, dan energi *exchange–correlation*, E_{XC} .

$$E_T = \sum_i \int \psi_i(\mathbf{r}) \left(-\frac{\nabla^2}{2} \right) \psi_i(\mathbf{r}) d(\mathbf{r}) + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + E_{XC}[\rho(\mathbf{r})] \quad (8)$$

Suatu hal yang menarik di sini adalah E_{XC} . Interaksi *exchange* dan *correlation* dibutuhkan karena aturan Pauli yang menyatakan bahwa dua partikel tidak boleh dalam satu keadaan yang sama. Salah satu upaya untuk mendefinisikan fungsional E_{XC} adalah dengan menggunakan pendekatan *Local Spin Density Approximation* (LSDA) yang mengasumsikan densitas gas elektron serta kontribusi spinnya dalam suatu ruang adalah sama untuk seluruh ruang atau homogen. Thomas, Fermi, dan Dirac mengusulkan persamaan energi *exchange* (E_X) berbentuk:

$$E_X^{\text{LSDA}} = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} \int \left(\rho_\alpha^{4/3}(\mathbf{r}) + \rho_\beta^{4/3}(\mathbf{r}) \right) d\mathbf{r}$$

Dengan α dan β menunjukkan keadaan spin elektron. Ini sebenarnya suatu pendekatan yang masih bersifat kasar sebab pada kenyataannya suatu sistem tidak akan homogen secara mutlak. Pendekatan yang sering disebut *General Gradient Approximation* (GGA) mengaproksimasikan bahwa densitas elektron dalam suatu sistem akan berbeda-beda atau berubah dengan kelajuan yang sangat lambat. Sebagai koreksi terhadap LSDA, Alex Becke mengusulkan persamaan E_X sebagai [6,20,21]:

$$E_X^{\text{B88}} = E_X^{\text{LSDA}} - \nabla \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int \rho_\sigma^{3/4} \frac{x_\sigma^2}{(1 + 6\beta x_\sigma \sinh^{-1} x_\sigma)} d\mathbf{r}$$

dengan, $x_\sigma = \frac{|\nabla \rho_\sigma|}{\rho_\sigma^{4/3}}$ dan $\nabla = 0.0042$ a.u. Persamaan di atas sering disebut persamaan B atau B88 (Becke88 sehubungan Becke mengajukan rumus tersebut pada tahun 1988). Pada sistem *non-homogenous electron gas*, digunakan persamaan E_C Lee–Yang–Parr (LYP). Persamaan LYP menyertakan komponen *local* dan *non-local* sekaligus:

$$E_C^{\text{LYP}} = -a_0 \int \frac{1}{1 + d\rho^{-1/3}} \{ r + a_x \rho^{-2/3} \gamma \} d\mathbf{r} \quad (11)$$

dengan

$$\gamma = \left[\frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \rho^{5/3} - 2t_W + \left(\frac{1}{9} t_W + \frac{1}{18} \nabla^2 \rho \right) e^{-cr - \frac{1}{2}} \right]$$

$$t_W = \sum_{i=1}^N \frac{|\nabla \rho_i(\mathbf{r})|^2}{\rho_i(\mathbf{r})} - \frac{1}{8} \nabla^2 \rho$$

Konstanta $a_0 = 0.049$, $a_x = 0.132$, $c = 0.349$, dan $d = 0.2533$ merupakan parameter yang diperoleh dari hasil eksperimen sementara t_w merupakan densitas energi kinetik lokal Weizsacker [22]. Jika persamaan E_C LYP digabung dengan E_X B maka didapatkan fungsional E_{XC} yang dinamakan BLYP. Pada dasarnya metode GGA untuk menentukan fungsional E_{XC} bukanlah sesuatu hal yang mutlak, tapi penelitian ini menggunakan fungsional macam ini karena telah ditemukannya aplikasi fungsional BLYP yang digunakan dalam konteks protein atau biomolekul.

4.2.2 Mekanika Molekuler

Satu hal kritis yang tidak dapat hindari saat bekerja dengan material (dalam konteks penelitian ini material biologis) adalah atom – atom pembentuk material tersebut terus bergerak. Oleh karena itu simulasi dinamika molekuler adalah suatu metode yang memungkinkan untuk mensimulasikan pergerakan atom dan molekul dengan menggunakan mekanika klasik dengan atom – atom dan ikatan antar atom diasumsikan sebagai kumpulan bola dan pegas.

Pertimbangkan situasi saat ada N atom dalam volume V , dan dinamika atom – atom tersebut ingin diamati pada waktu yang tertentu. Spesifikasi konfigurasi atom dilakukan dengan spesifikasi posisi $3N$ $\{r_1, \dots, r_{3N}\}$ dan $3N$ kecepatan $\{v_1, \dots, v_{3N}\}$. Dua nilai yang berguna untuk mendeskripsikan keadaan keseluruhan sistem adalah energi kinetik,

$$K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} m_i v_i^2 \quad (12)$$

dan energi potensial

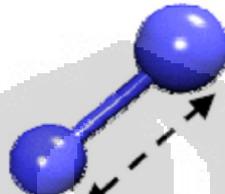
$$U = U(r_1, \dots, r_{3N}) \quad (13)$$

dengan m_i adalah massa atom pada koordinat ke- i .

Energi potensial sistem merupakan suatu hal signifikan karena karakteristik biomolekul yang akan disimulasikan berdasarkan energi potensial sistem. Energi potensial sistem digambarkan dengan suatu kolektif yang dinamakan medan gaya dan dalam penelitian ini medan gaya yang digunakan untuk mengkarakterisasi sistem adalah medan gaya CharmM (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics), dengan persamaan [23,35]:

$$\begin{aligned}
 U = & \sum k(b - b_0)^2 + \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum K_{UB}(u - u_0) \\
 & + \sum k_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum \epsilon \left[\left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} + \left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned}
 \tag{14}$$

Komponen pertama merupakan komponen energi akibat peregangan ikatan dan lebih dikenal sebagai energi vibrasi. k adalah konstanta peregangan ikatan dan b merupakan posisi dua atom meregang sementara b_0 adalah posisi saat setimbang.



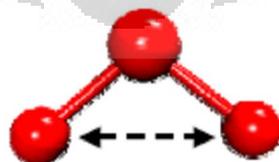
Gambar 4.5 Vibrasi molekul diatomik

Komponen kedua adalah komponen energi *bending* dimana k_θ konstanta *bending*, θ merupakan sudut saat *bending* dan θ_0 sudut saat setimbang.



Gambar 4.6 Bending molekul.

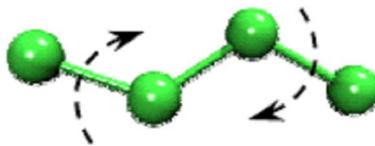
Komponen energi ketiga dinamakan komponen energi Urey – Bradley yang mendeskripsikan peregangan suatu struktur triatomik. Dengan K_{UB} adalah konstanta Urey – Bradley, u jarak atom 1,3 saat peregangan, dan u_0 jarak atom saat setimbang. Komponen energi Urey-Bradley ini merupakan komponen energi tambahan yang hanya dijumpai pada CharmM.



Gambar 4.7 Penggambaran interaksi Urey - Bradley

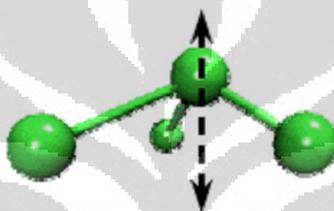
Komponen keempat merupakan energi torsional akibat rotasi struktur yang terdiri dari dua atom. n adalah suatu bilangan yang mendeskripsikan periodisitas rotasi, jadi jika $n = 1$ maka

terjadi perputaran 360 derajat, $n = 2$ terjadi perputaran 180 derajat, dan $n = 3$ merupakan perputaran 120 derajat. ϕ dan δ adalah sudut yang dibentuk oleh rotasi – rotasi yang terjadi.



Gambar 4.8 Penggambaran rotasi torsional

Komponen kelima merupakan komponen *out of plane bending* karena adanya atom sentral yang bervibrasi terhadap bidang yang dibentuk oleh atom – atom yang lain. Biasanya komponen ini disebut sebagai energi dihedral.



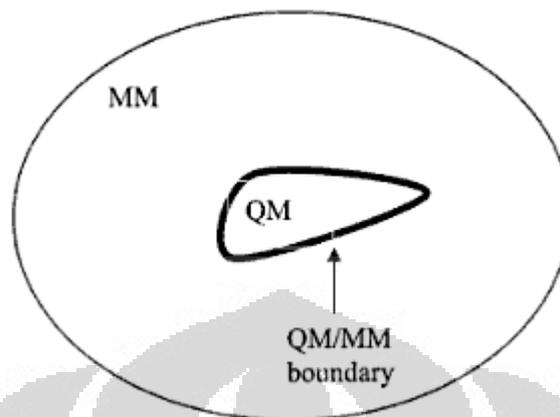
Gambar 4.9 Penggambaran *out of plane bending*

Komponen keenam merupakan energi interaksi van der Waals yang menggunakan potensial Leonard-Johns 12-6, dimana faktor pangkat 12 menandakan atraksi yang dialami atom dan faktor 6 menandakan repulsi. Komponen keenam merupakan energi potensial elektrostatik yang dialami atom – atom penyusun.

4.2.3 Metode Mekanika Kuantum/ Mekanika Molekuler (QM/MM)

Subbab mengenai mekanika klasik dan kuantum dapat memberikan gambaran bahwa sistem terpartisi menjadi dua dan independen terhadap masing-masing eksistensinya. Namun dalam perhitungan energi, suatu metode telah dikembangkan supaya sub-sistem kuantum dan sub-sistem klasik dapat diperhitungkan secara simultan. Metode tersebut dinamakan metode QM/MM (Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics) [23-24,34]. Mekanika molekuler telah disebutkan dapat menggambarkan struktur molekuler global berdasarkan pandangan fisika klasik dengan penggambaran pergerakan yang dilakukan oleh ‘bola dan pegas’. Mekanika kuantum di lain pihak dapat menggambarkan keadaan yang terjadi serta pembentukan atau pemutusan ikatan. QM/MM berlaku sebagai perhitungan yang representatif dari segi

mekanika molekuler dan mekanika kuantum yang disertakan dengan “jembatan” antar sub-sistem (Gambar 4.10)



Gambar 4.10 Pembagian domain antara MM dan QM²³.

Hamiltonian dengan kopling spin-orbital adalah:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_i} \sum \nabla_i^2 - \frac{\hbar^2}{2} \sum \frac{1}{m_\alpha} \nabla_\alpha^2 + \sum_i \sum_{i<j} \frac{e^2}{r_{ij}} + \sum_\alpha \sum_{\alpha<\beta} \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{R_{\alpha\beta}} - \sum \frac{Z_\alpha e^2}{r_{\alpha i}} \quad (15)$$

Born-Oppenheimer menyatakan bahwa energi kinetik inti atom dapat diabaikan sehingga:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_i} \sum \nabla_i^2 + \sum_i \sum_{i<j} \frac{e^2}{r_{ij}} + \sum_\alpha \sum_{\alpha<\beta} \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{R_{\alpha\beta}} - \sum \frac{Z_\alpha e^2}{r_{\alpha i}} \quad (16)$$

QM/MM memiliki konsep bahwa sistem dapat dipartisi menjadi domain QM dan domain MM. Ini memberikan Hamiltonian:

$$H = H_{QM} + H_{QM/MM} + H_{MM} \quad (17)$$

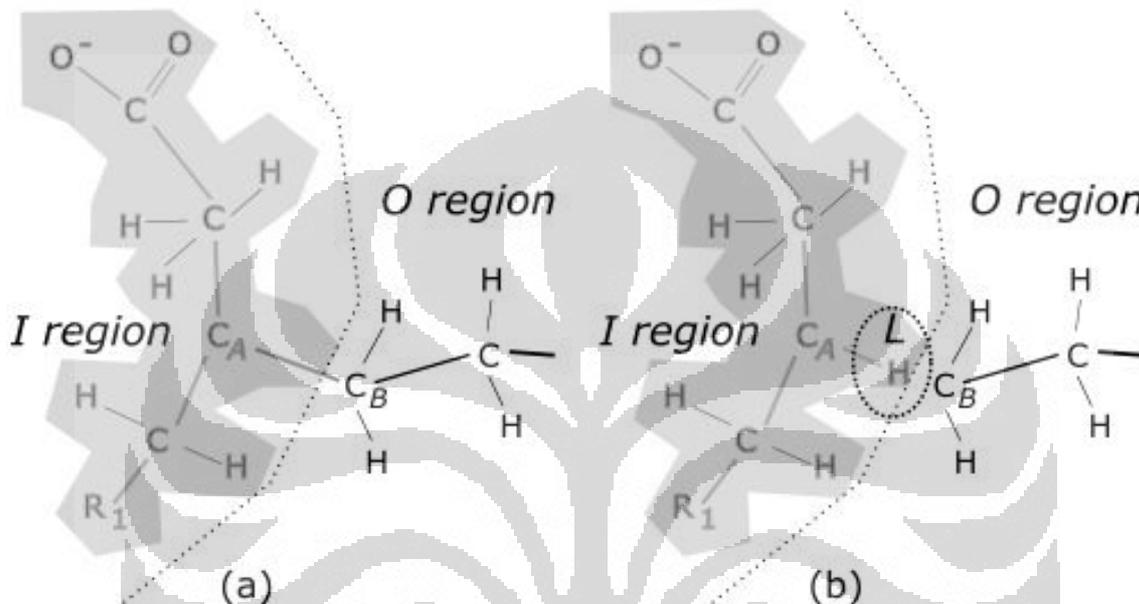
Jika H_{MM} merupakan Hamiltonian yang menggambarkan medan gaya mekanika molekuler maka energi sistem keseluruhan adalah:

$$E = \langle \psi | H_{QM} + H_{MM} | \psi \rangle + E_{MM} \quad (18)$$

$H_{QM/MM}$ bergantung pada model QM/MM. Kuantitas ini berhubungan dengan interaksi antara atom – atom *non-bonded* dalam medan gaya klasik dan biasanya terdekomposisi menjadi bagian interaksi elektrostatik dan densitas elektronik sub-sistem kuantum. Jika

interaksi QM/MM digambarkan hanya oleh muatan titik jarak jauh q_M pada sub sistem kuantum dan potensial Leonard Johns 6-12 pada sub-sistem klasik maka:

$$H_{QM/MM} = -\sum \frac{q_M e}{r_{iM}} + \sum \frac{Z_\alpha q_M e^2}{R_{\alpha M}} + \sum \left\{ \frac{a_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{b_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^6} \right\} \quad (19)$$



Gambar 4.11 (a) Pembagian domain kuantum I dan domain klasik O yang dipisah oleh garis putus – putus. (b) Link atom L yang dihubungkan dengan rantai C di perbatasan domain kuantum. (Diambil dari piranti lunak Discovery Studio 2.1)

4.2.4 Solvasi Implisit – Generalized Born with Molecular Volume

Sistem biomolekuler yang ditemukan di alam umumnya dalam lingkungan cair. Pentingnya pengaruh solvasi (atau pelarutan) terhadap struktur, energi, dan dinamika biomolekul telah lama dikenal. Secara ideal solvasi suatu sistem molekul secara eksplisit, dengan cara menambahkan molekul- molekul pelarut seperti air pada sistem biomolekul, dalam suatu simulasi merupakan deskripsi suatu sistem molekuler yang paling akurat. Dalam sistem dengan solvasi eksplisit, molekul pelarut merupakan 85 persen dari volume total sehingga solvasi secara eksplisit merupakan satu langkah yang mahal.

Alternatif yang kian sering digunakan dalam simulasi sitem biomolekuler adalah model solvasi secara implisit. Dalam simulasi solvasi implisit, pengaruh polar dan nonpolar pelarutnya diperhitungkan secara rata – rata, tanpa secara langsung melibatkan molekul – molekul pelarut dalam perhitungan.

Dalam model solvasi implisit energi bebas suatu struktur terdiri dari beberapa komponen: Energi medan gaya fase gas E_{gas} dan energi bebas solvasi G_{solv} :

$$E_{tot} = E_{gas} + G_{solv} \quad (20)$$

Energi bebas solvasi bisa didefinisikan lebih lanjut sebagai penjumlahan atas kontribusi interaksi elektrostatik dan nonpolar, dan bisa ditulis sebagai:

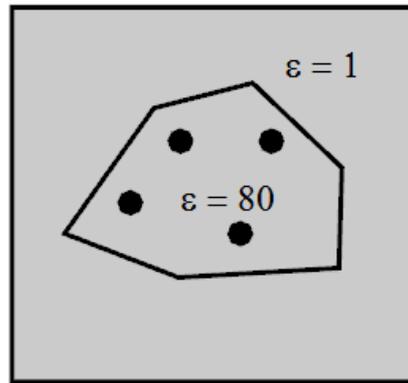
$$G_{solv} = G_{elec} + G_{np} \quad (21)$$

Energi bebas elektrostatik G_{elec} memperhitungkan interaksi elektrostatik antara molekul protein dengan pelarut. Sebagai substitusi atas interaksi antara molekul - molekul protein dengan molekul - molekul pelarut, lingkungan protein dimodelkan sebagai suatu medium dielektrik kontinu. Komponen inilah yang biasanya dimodelkan lebih lanjut dengan model Generalized Born atau Poisson-Boltzmann. Interaksi nonpolar yang dilambangkan G_{np} merupakan kontribusi interaksi hidrofobik dan interaksi van der Waals antara molekul protein dan pelarut. Umumnya, G_{np} sebanding dengan luas SAS.

$$G_{np} = a \times SAS + b \quad (22)$$

Dimana a adalah koefisien luas permukaan dan b konstan.

Salah satu teknik pemodelan dalam memodelkan solvasi implisit adalah dengan menggunakan model *Generalized Born* (GB). Dalam model GB, sistem biomolekul dimodelkan dalam suatu medium dielektrik kontinu sebagai upaya untuk menggantikan molekul - molekul pelarut secara eksplisit seperti dalam solvasi eksplisit. Medium dielektrik kontinu tersebut adalah daerah di dalam suatu volume yang terbentuk oleh permukaan van der Waals masing - masing atom pembentuk struktur biomolekul. Selebihnya daerah yang tidak termasuk dalam struktur biomolekul dan volume yang terbentuk oleh permukaan van der Waals masing - masing atom memiliki konstanta dielektrik dalam ruang hampa untuk memudahkan perhitungan saat simulasi.



Gambar 4.12 Visualisasi atas model Generalized Born. Sistem biomolekul yang telah mengalami solvasi implisit memiliki konstanta dielektrik yang berbeda dengan lingkungan kelilingnya. Dicontohkan dalam gambar bahwa sistem biomolekul memiliki konstanta dielektrik air sementara lingkungan di luarnya memiliki konstanta dielektrik dalam ruang hampa.

Dalam GB, energi elektrostatis solvasi implisit struktur biomolekul dengan dielektrik ϵ_{solute} dan pelarut $\epsilon_{\text{solvent}}$ merupakan penjumlahan atas interaksi muatan dari pasangan atom. Sehingga E_{elec} pada persamaan (21) bisa ditulis ulang sebagai [25,36]:

$$E_{GB} = k \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_i \alpha_j \exp(-r_{ij}^2 K_s \alpha_i \alpha_j)}} \quad (23)$$

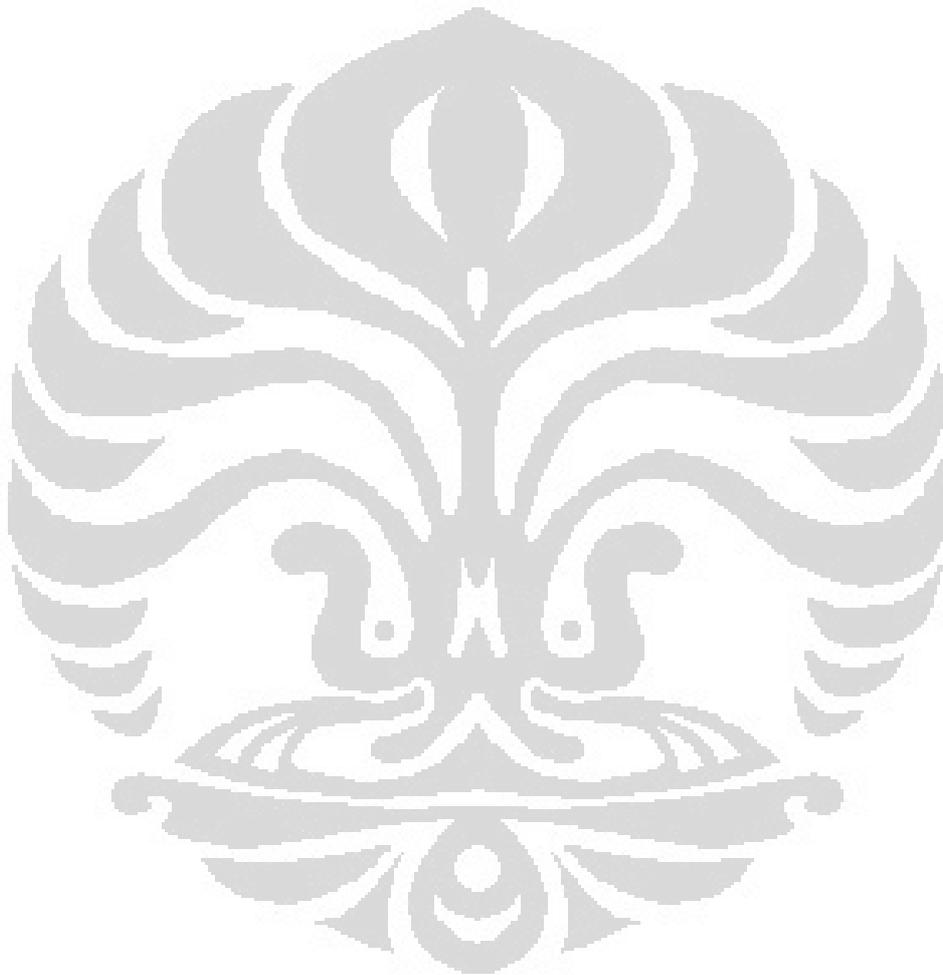
dimana q_i adalah muatan pada atom i , r_{ij} jarak antara atom i dan j , dan $k = -166.0(\epsilon_{\text{solute}}^{-1} - \epsilon_{\text{solvent}}^{-1})$ dengan $\epsilon_{\text{solute}}^{-1}$ adalah konstanta dielektrik pada daerah struktur biomolekul. Radius Born atom, α_i , berbanding terbalik dengan energi bebas polarisasi diri (*self-polarization*) atom, $\alpha_i = kq_i^2/G_{\text{pol}}$. Konstanta K_s merupakan suatu konstanta dengan nilai 8 yang didapatkan melalui fitting.

Model GB dibedakan atas definisi G_{pol} , yaitu energi bebas yang dimiliki sistem untuk mempolarisasikan muatan dalam sistem. Salah satu model GB yang telah terdokumentasikan menghasilkan perhitungan yang akurat adalah *Generalized Born with Molecular Volume* dimana radius Born dihitung dengan mengintegrasikan volume molekuler sistem.

$$G_{\text{pol}} = -k \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{4\pi} \iiint_{|\vec{r}-\vec{x}|>R} \frac{V(\vec{r})}{|\vec{r}-\vec{x}|^4} dx dy dz \right) + kP \sqrt{\frac{1}{2R^2} - \frac{1}{4\pi} \iiint_{|\vec{r}-\vec{x}|>R} \frac{V(\vec{r})}{|\vec{r}-\vec{x}|^5} dx dy dz}$$

(24)

Bagian pertama dari persamaan (24) merupakan analogi dari interaksi Coulomb yang dialami atom – atom pembentuk sistem dengan R memiliki nilai lebih kecil atau sama dengan radius vdW (van der Waals) atom i , R_i . Sementara bagian kedua dari persamaan (24) merupakan faktor koreksi yang diturunkan secara empiris.



BAB V

HASIL DAN DISKUSI

5.1 Pemodelan Struktur Molekul

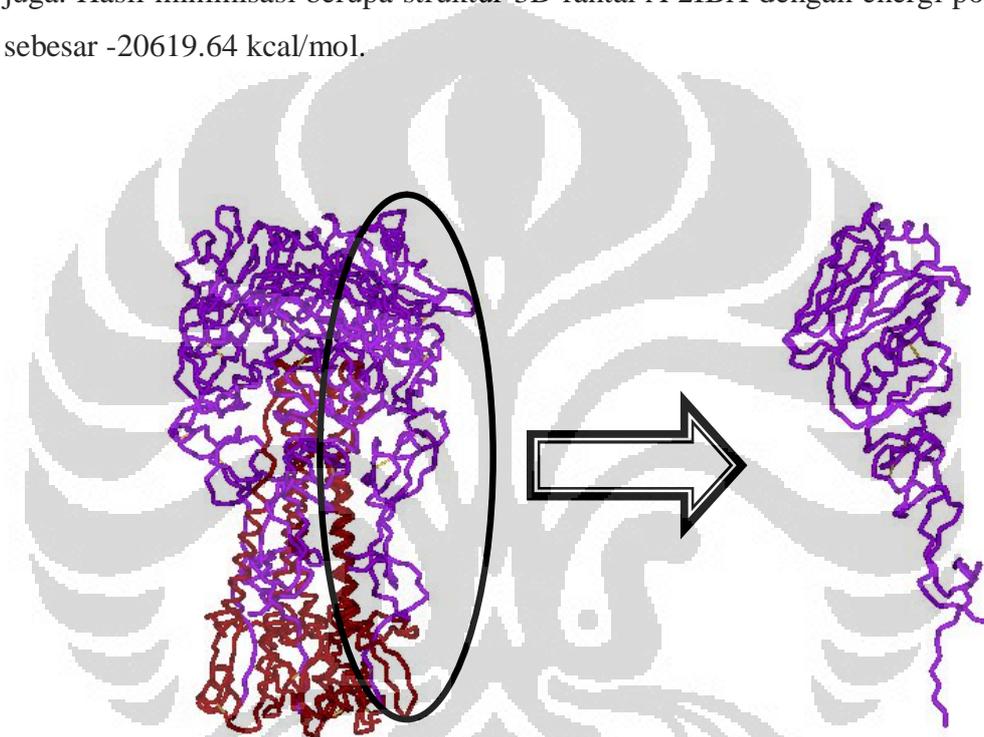
Tahap pertama dalam penelitian ini adalah pemodelan struktur molekul. Pemodelan struktur yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi tiga biomolekul, yaitu dua struktur tiga dimensi Hemagglutinin HA H5N1 dan satu struktur tiga dimensi fragmen variabel antibodi 8H5. Dalam bab ini akan dibandingkan HA virus strain Vietnam (HA – 2IBX) dengan HA virus strain Indonesia (HA – CDC). Pada subbab 5.1.1 akan dijelaskan mengenai struktur HA Vietnam. Subbab 5.1.2 akan membahas mengenai struktur virus strain Indonesia. Adapun perbandingan yang dilakukan terhadap struktur HA strain Vietnam dan struktur HA strain Indonesia dalam subbab 5.1.2. Pada subbab terakhir 5.1.3 akan dibahas mengenai struktur fragmen variable antibody 8H5. Setelah mendapatkan struktur molekul. Dilakukan proses minimisasi untuk mendapatkan struktur molekul yang optimum baik secara struktural maupun energetik.

5.1.1 HA - 2IBX

Struktur biomolekul pertama yang akan dimodelkan adalah struktur molekul HA 2IBX. HA 2IBX merupakan hemagglutinin virus H5N1 strain Vietnam dengan kode VN1194. Model struktur 3D molekul Hemagglutinin (HA) 2IBX merupakan model struktur 3D yang dihasilkan kristalografi sinar-X dan dapat diunduh di website Protein Data Bank - Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) <http://www.rcsb.org>. HA adalah struktur homotrimer yaitu protein yang terbentuk dari tiga molekul polipeptida yang identik. Dalam penelitian ini hanya rantai A 2IBX, yang terdiri dari 321 asam amino, yang diperhitungkan karena interaksi yang terjadi pada rantai ini dapat merepresentasikan interaksi yang secara identik bisa terjadi pada rantai – rantai (bagian kepala) yang lain. (Gambar 5.1)

Struktur 2IBX rantai A hasil pemindaian XRD kemungkinan bukan struktur yang terelaksasi sehingga terdapat atom – atom yang bersentuhan atau

malah tumpang tindih. Dalam keadaan ini struktur tidak optimum karena atom – atom yang tumpang tindih energi yang diperlukan untuk mempertahankan struktur tersebut cenderung besar. Supaya struktur berada dalam keadaan optimum proses minimisasi dilakukan terhadap struktur. Minimisasi struktur 2ibx A melalui dua tahap secara berurutan. Tahap pertama adalah minimisasi 10000 langkah dengan algoritma Steepest Descent lalu dilanjutkan dengan tahap kedua yaitu minimisasi dengan menggunakan algoritma Conjugate Gradient sebanyak 10000 langkah juga. Hasil minimisasi berupa struktur 3D rantai A 2IBX dengan energi potensial sebesar -20619.64 kcal/mol.



Gambar 5.1 Isolasi rantai A(kanan) dari HA 2IBX utuh (kiri; ungu menandakan bagian kepala HA dan merah menandakan bagian kaki atau stalk region). Rantai backbone HA digambarkan dalam bentuk pipa.

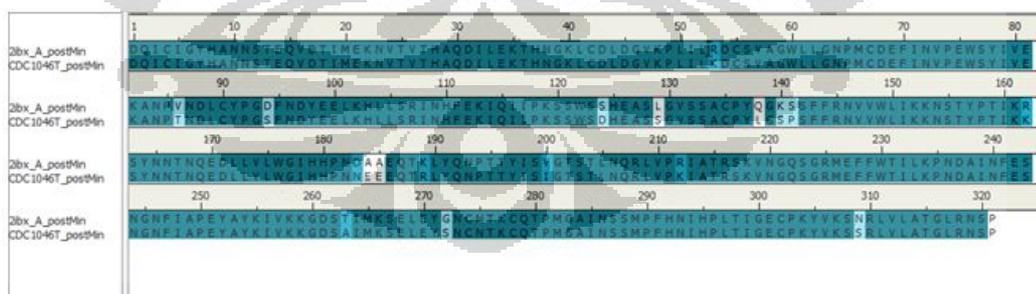
Fungsi proses minimisasi adalah untuk mendapatkan structure yang paling terelaksasi. Perbaikan struktur ditandai dengan energi sistem yang menjadi lebih negatif. Penurunan energi mengindikasikan bahwa untuk mempertahankan struktur tersebut energi yang digunakan sangat sedikit. Energi potensial awal sistem dihitung sebesar -2330.46 kcal/mol sementara energi potensial setelah minimisasi sebesar -20619.64 kcal/mol. Dari data tadi maka terlihat bahwa nilai energi potensial setelah minimisasi lebih negatif dibandingkan struktur awal

sehingga bisa dikatakan bahwa struktur dalam keadaan terelaksasi setelah minimisasi.

5.1.2. HA - CDC

Dalam penelitian ini virus H5N1 strain Indonesia diperoleh dari virus yang diisolasi dari penderita asal Indonesia berumur 22 tahun dan berkelamin perempuan. Dalam data base National Center for Biotechnology Information virus yang diisolasi tersebut memiliki index virus (A/Indonesia/CDC1046T/2007(H5N1)). Sebagai upaya penyederhanaan penamaan, HA asal Indonesia ini akan dinamakan CDC. Sekuens asam amino HA CDC didapatkan dari situs National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. HA CDC terdiri dari 321 residu asam amino.

Dalam mengubah data sekuens asam amino menjadi struktur 3D molekul digunakan homology modeling yang tersedia pada server Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). Hasil pengolahan server memperlihatkan kesamaan antara rantai A 2IBX dan sekuens HA CDC dengan akurasi 95.4% oleh karena itu rantai A 2IBX dapat dipergunakan sebagai *template*. Berdasarkan *template* rantai A 2IBX ditemukan adanya 18 residu mutasi pada virus H5N1 asal Indonesia (CDC) yang dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 'Sequence alignment' antara 2IBX dan CDC (penomoran posisi asam amino berdasarkan konsensus).

Energi potensial sistem struktur CDC hasil homologi modeling terhitung sebesar -5055.63 kcal/mol. Struktur CDC hasil homologi merupakan struktur yang belum optimum. Agar struktur CDC optimum maka minimisasi dilakukan terhadap struktur CDC. Gambar 5.3 memperlihatkan struktur CDC yang telah

melalui proses minimisasi dan untuk struktur ini didapatkan energi potensial sistem sebesar -20698 kcal/mol. Nilai energi potensial struktur CDC pasca minimisasi jauh lebih negatif dibandingkan dengan struktur awal. Hal ini menandakan bahwa struktur mencapai struktur optimum.

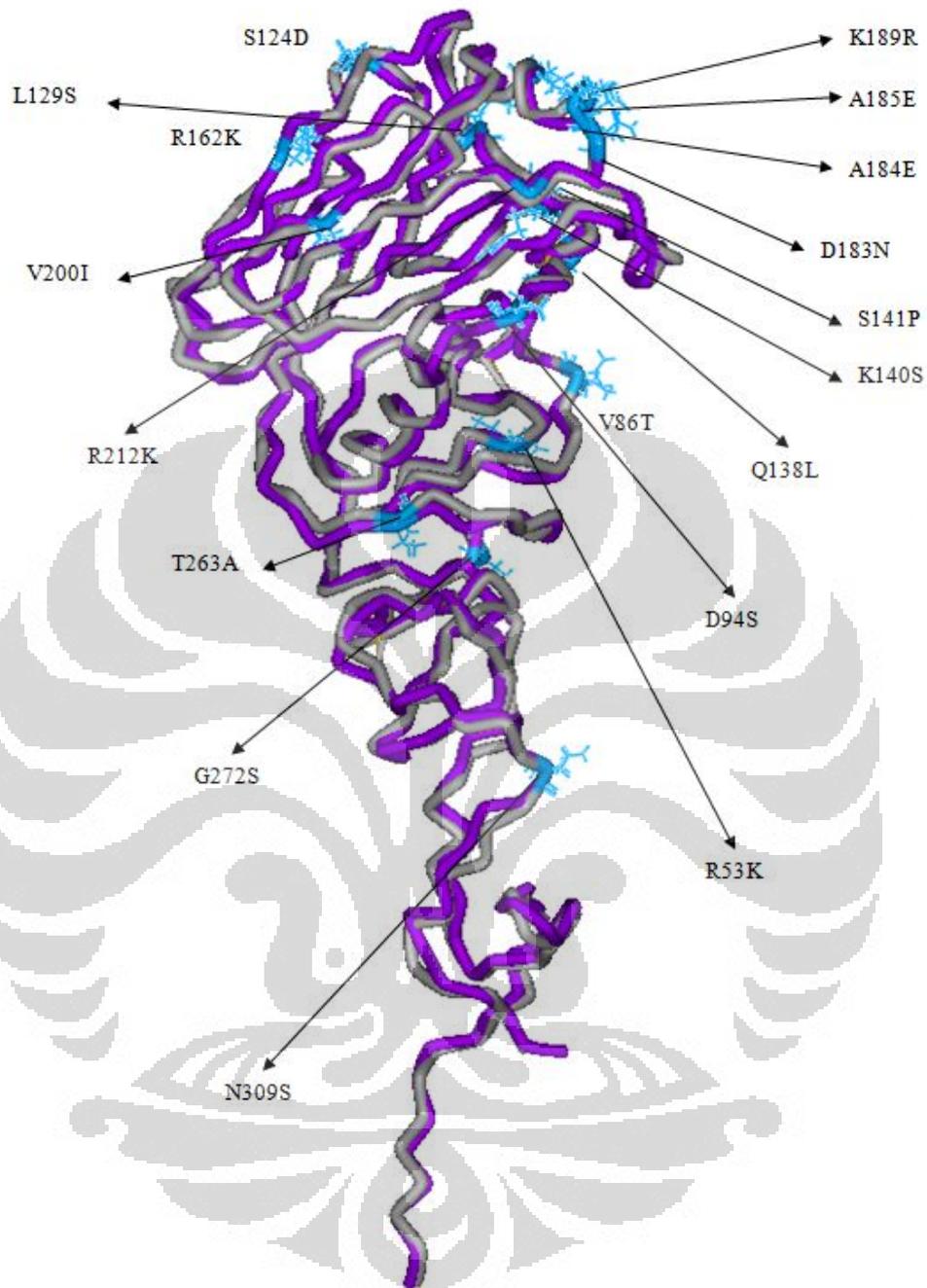


Gambar 5.3 Struktur 3D CDC setelah minimisasi. Rantai backbone HA digambarkan dalam bentuk pipa.

Suatu hal yang menarik untuk diamati adalah perbandingan struktur antara struktur optimum 2ibx dan struktur optimum CDC. Telah disebutkan sebelumnya bahwa CDC digenerasikan dari template rantai A 2ibx dimana 18 asam amino rantai A 2ibx dimutasikan untuk mendapatkan struktur CDC. Mutasi pada virus asal Indonesia (CDC) yang ditemukan berdasarkan template rantai A 2ibx dituliskan kembali pada Tabel 5.1. 18 mutasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.5.

Tabel 5.1 Residu Asam Amino 2IBX yang mengalami mutasi sehingga menjadi CDC

Asam Amino	Posisi (berdasarkan konsensus)	Mutasi	Asam Amino	Posisi (berdasarkan konsensus)	Mutasi
Arginin (R)	53	Lysin (K)	Aspartat (D)	183	Asparagin (N)
Valin (V)	86	Threonin (T)	Alanin (A)	184	Glutamat (E)
Aspartat (D)	94	Serin (S)	Alanin (A)	185	Glutamat (E)
Serin (S)	124	Aspartat (D)	Lysin (K)	189	Arginin (R)
Leusin (L)	129	Serin (S)	Valin (V)	200	Isoleusin (I)
Glutamin (Q)	138	Leusin (L)	Arginin (R)	212	Lysin (K)
Lysin (K)	140	Serin (S)	Threonin (T)	263	Alanin (A)
Serin (S)	141	Prolin (P)	Glysin (G)	272	Serin (S)
Arginin (R)	162	Lysin (K)	Asparagin (N)	309	Serin (S)
Arginin (R)	162	Lysin (K)			

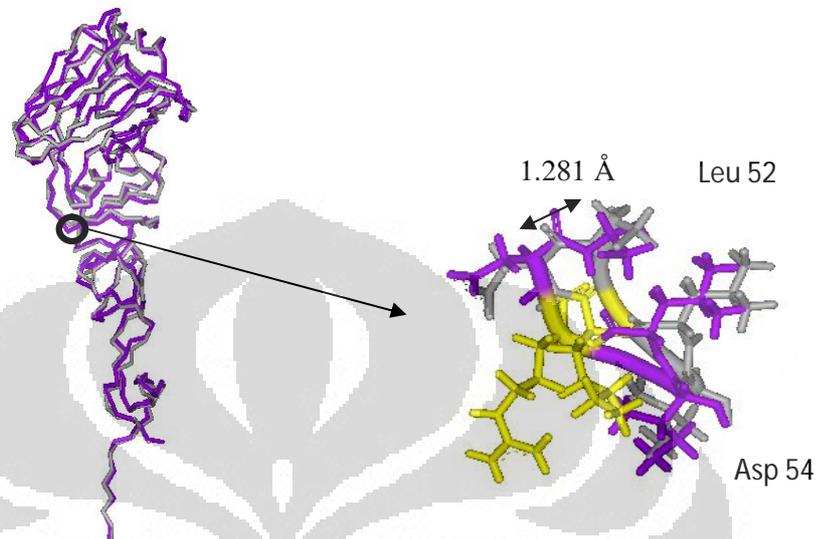


Gambar 5.4 2IBX (ungu) yang di-fitting dengan CDC (abu – abu) setelah masing – masing melalui minimisasi energi. Mutasi ditandai dengan warna biru.

a) Mutasi R53K

Mutasi R53K adalah mutasi asam amino pada posisi 53 yang pada awalnya adalah Arginin (R), dengan berat molekul 174 Da, termutasi menjadi Lysin (K), dengan berat molekul 146 Da. Gambar 5.5 memperlihatkan

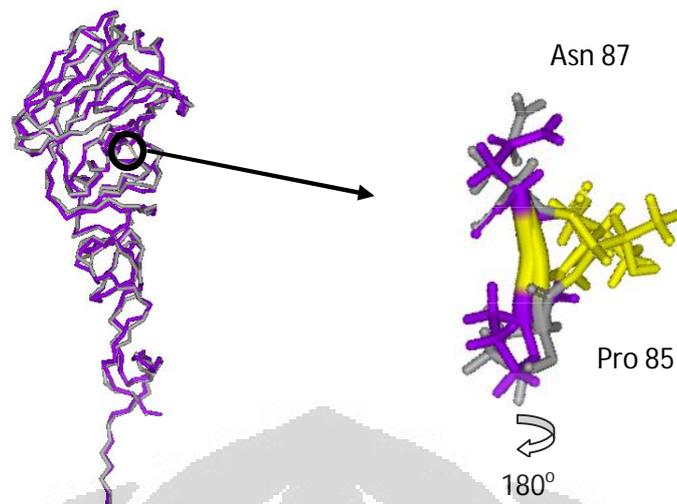
pergeseran posisi rantai backbone lysin terhadap rantai backbone Arginin sebesar 1.281 Å. Perhitungan energi ikat pada titik mutasi menghasilkan kenaikan energi ikat sebesar 18.839 kcal/mol.



Gambar 5.5 Mutasi R53K (kuning) 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu). Mutasi mengakibatkan pergeseran rantai backbone sebesar 1.281 Å.

b) Mutasi V86T

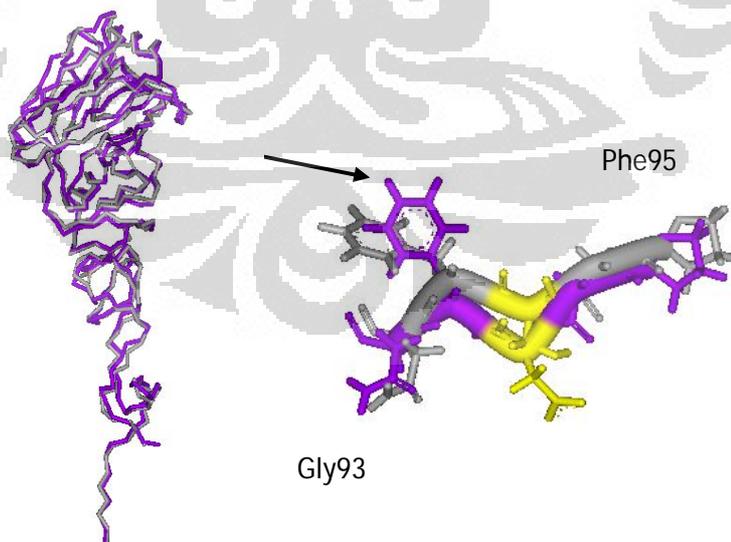
Mutasi V86T tidak memperlihatkan perubahan yang signifikan. Mutasi pada posisi 86 terlihat tidak terlalu menimbulkan suatu perubahan besar pada rantai backbone. Pada mutasi ini asam amino Valin, dengan berat molekul 117 Da, termutasi menjadi asam amino Threonin, dengan berat molekul 119 Da. Di samping itu posisi rantai Pro 85 terrotasi sebesar 180°. Mutasi ini dapat dilihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Mutasi V86T. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

c) Mutasi D94S

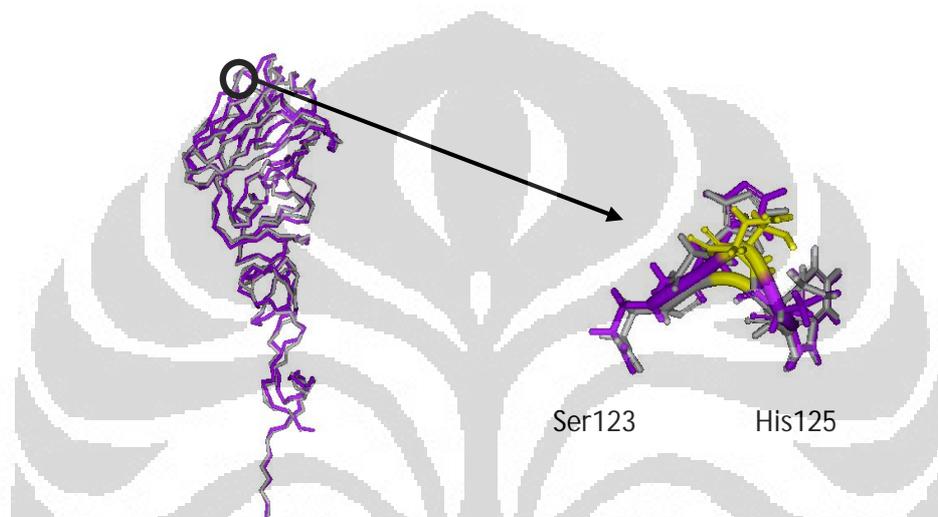
Pada gambar 5.7 diperlihatkan mutasi D94S dimana asam amino Aspartat, dengan berat molekul 133 Da, termutasi menjadi Serin, dengan berat molekul 105 Da. Di samping itu pergeseran rantai backbone CDC dari posisi 2ibx juga teramati sebesar 1.885 Å. Hasil perhitungan energi memperlihatkan bahwa mutasi ini juga menyebabkan energi ikat turun sebesar 30.373 kcal/mol.



Gambar 5.7 Mutasi D94S. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

d) Mutasi S124D

Mutasi S124D menunjukkan mutasi asam amino Serin, dengan berat molekul 105 Da, menjadi Aspartat, dengan berat molekul 133 Da. Mutasi ini menyebabkan pergeseran ranti backbone CDC dari posisi 2ibx sebesar sebesar 0.611 Å, dimana jarak diukur dari rantai C α asam amino posisi 124. Selain itu, hasil perhitungan energi ikat lokasi asam amino mutasi naik sebesar 32.1 kcal/mol.



Gambar 5.8 Mutasi S124D. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

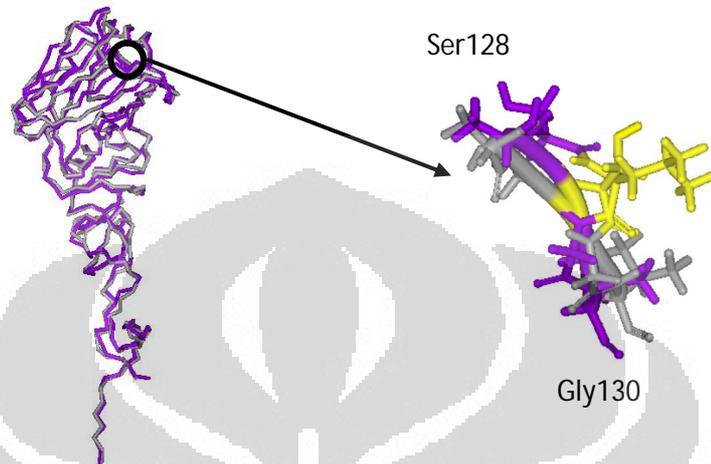
e) Mutasi L129S

Gambar 5.9 memperlihatkan rantai HA CDC dan 2ibx yang berhimpit walaupun terjadi mutasi pada posisi ini. Perubahan posisi rantai backbone yang tidak terlalu signifikan dapat disebabkan oleh miripnya berat molekul asam amino Leusin, dengan berat molekul 131 Da, dan Aspartat, dengan berat molekul 133 Da.

f) Mutasi Q138L

Posisi 138 merupakan titik mutasi dimana Glutamin bermutasi menjadi Leusin. Mutasi menyebabkan rantai backbone bergeser sejauh 1.498 Å (Gambar 5.10). Selisih berat molekul antara Glutamin dan Leusin sebesar 16 Da dimana

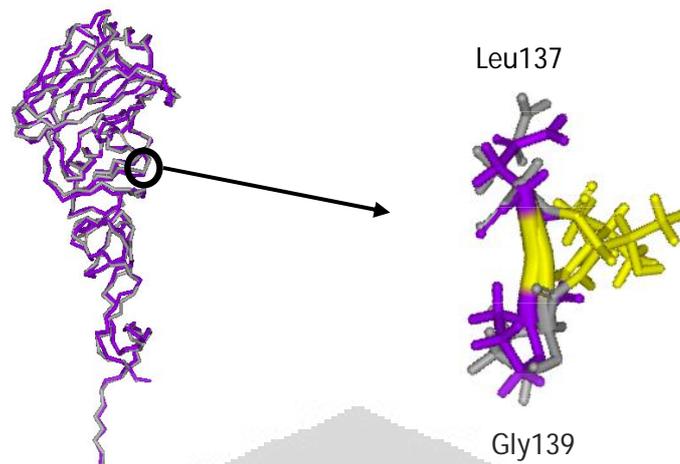
Glutamin lebih berat. Di samping itu hasil perhitungan energi ikat setelah mutasi menguat sebesar 11.414 kcal/mol.



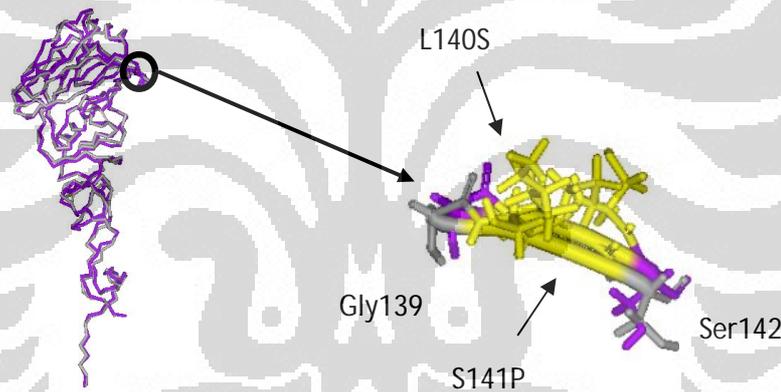
Gambar 5.9 Mutasi L129S. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

g) Mutasi L140S dan S141P

Gambar 5.11 memperlihatkan mutasi pada posisi 140 dimana Leusin menjadi Serin dan mutasi pada posisi 141 dimana asam amino Serin menjadi Prolin. Mutasi 141 tidak memperlihatkan adanya pergeseran backbone sefangkan mutasi pada posisi 141 rantai backbone bergeser 1.715 Å. Selain pergeseran backbone pada posisi 141, energi ikat posisi 140 dan 141 setelah mutasi menurun sebesar 48.745 kcal/mol.



Gambar 5.10 Mutasi Q138L. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

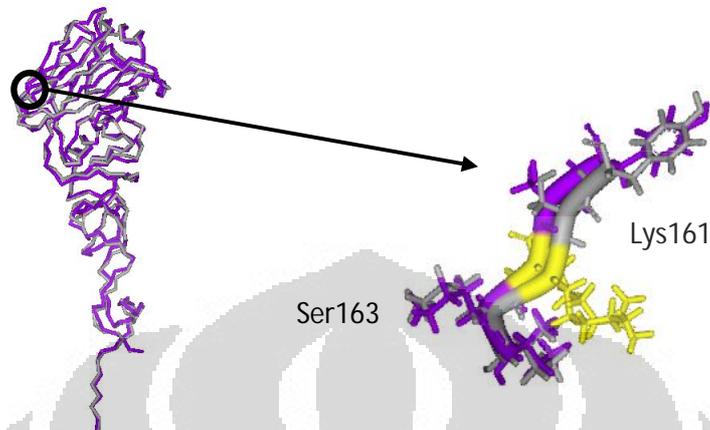


Gambar 5.11 Mutasi L140S dan S141P. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

h) Mutasi R162K

Mutasi pada posisi 162 merupakan salah satu peristiwa dimana mutasi mempengaruhi lingkungan lokal. Pada posisi 162 asam amino Arginin, dengan berat molekul 174 Da, bermutasi menjadi Lysin, dengan berat molekul 146 Da. Konformasi 2ibx pada posisi 161 hingga posisi 163 adalah struktur sekunder beta sheet. Namun setelah posisi 162 mengalami mutasi konformasi beta sheet hanya sampai posisi 162 saja. Mutasi R162K menyebabkan pergeseran rantai backbone

sebesar 1.194 \AA . Di samping itu hasil perhitungan energi menghasilkan mutasi pada posisi 162 mengalami penurunan energi ikat sebesar 21.773 kcal/mol .

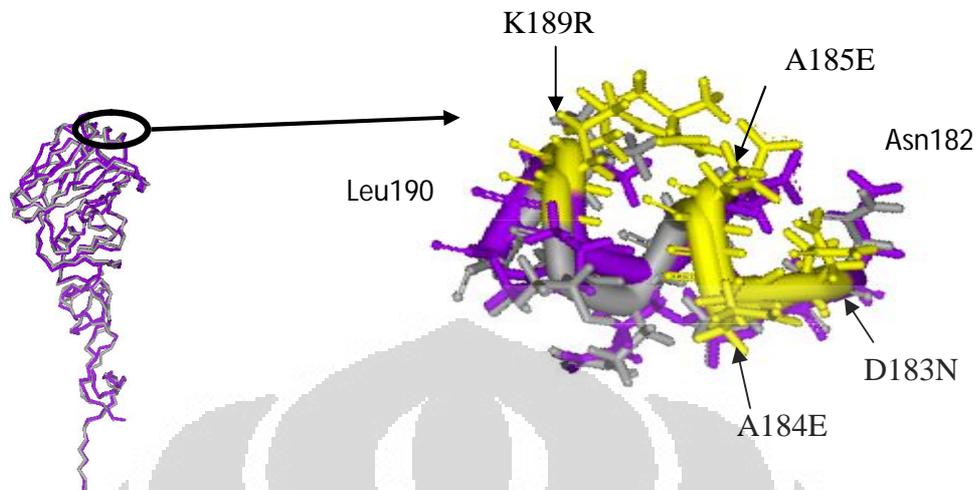


Gambar 5.12 Mutasi R162K. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

i) Mutasi D183N, A184E, A185E dan K189R

Berbeda dengan mutasi R162K mutasi pada posisi 183, 184, dan 185 tidak memberikan perubahan konformasi sehingga tidak memperlihatkan perubahan yang signifikan. Konformasi alpha helix pada posisi 183 hingga 185 tetap terjaga setelah mutasi. Walaupun mutasi terjadi di tiga posisi yang berurutan, perubahan hanya terlihat dari naiknya energi ikat ketiga residu tersebut sebesar 145.7 kcal/mol dan menggesernya backbone posisi 184 sejauh 0.968 \AA .

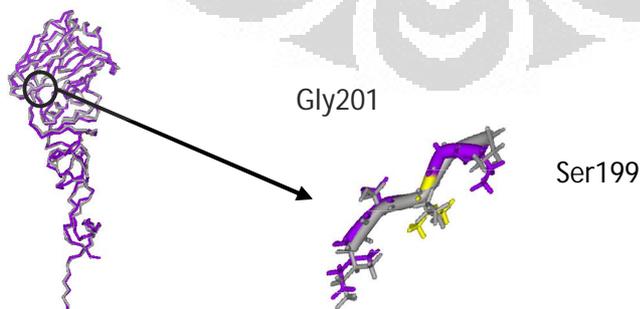
Posisi 189 memperlihatkan mutasi asam amino Lysin, dengan berat molekul 146 Da , menjadi Arginin, dengan berat molekul 174 Da . Mutasi ini menunjukkan pergeseran rantai backbone sebesar 0.623 \AA . Selain itu hasil perhitungan energi ikat sistem menunjukkan bahwa energi ikat sistem menguat hingga 36.049 kcal/mol .



Gambar 5.13 Mutasi D183N, A184E, dan A185E. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

j) Mutasi V200I

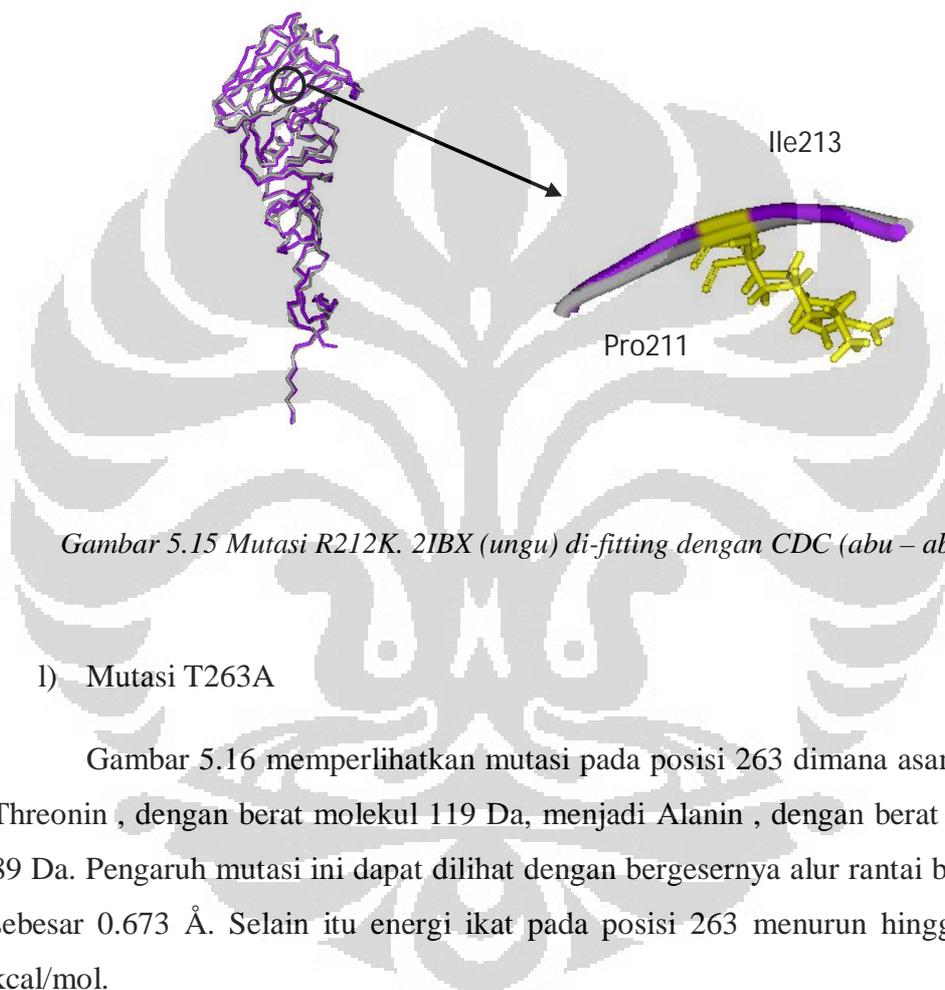
Asam amino Valin, dengan berat molekul 117 Da, pada posisi 200 yang bermutasi menjadi Isoluesin, dengan berat molekul 131 Da, tidak memberikan efek kepada konformasi posisi itu. Namun efek yang diberikan adalah kepada asam amino dari posisi 201 hingga 206. Pada daerah itu rantai backbone CDC berbentuk persegi sementara rantai back bone 2IBX berbebtuk setengah elips. Di samping itu energi ikatasam amino posisi 200 menguat sebesar 28.55 kcal/mol.



Gambar 5.14 Mutasi V200I. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu). Ditampilkan dalam bentuk struktur sekunder.

k) Mutasi R212K

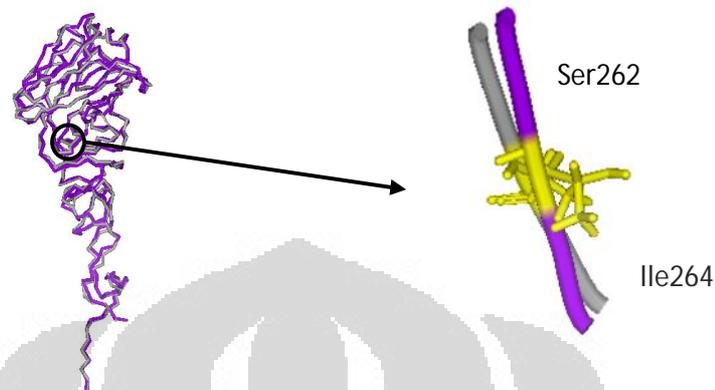
Gambar 5.15 memperlihatkan asam amino Arginin bermutasi menjadi Lysin pada posisi 212, namun tidak terlihat ada perbedaan yang signifikan walaupun berat molekul Arginin 28 Da lebih berat daripada Lysin. Perubahan pada struktur sistem lokal pun juga tidak terlihat walaupun perhitungan energi ikat memperlihatkan adanya penurunan energi sebesar 20.48 kcal/mol pada posisi 212.



Gambar 5.15 Mutasi R212K. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

l) Mutasi T263A

Gambar 5.16 memperlihatkan mutasi pada posisi 263 dimana asam amino Threonin , dengan berat molekul 119 Da, menjadi Alanin , dengan berat molekul 89 Da. Pengaruh mutasi ini dapat dilihat dengan bergesernya alur rantai backbone sebesar 0.673 Å. Selain itu energi ikat pada posisi 263 menurun hingga 30.77 kcal/mol.



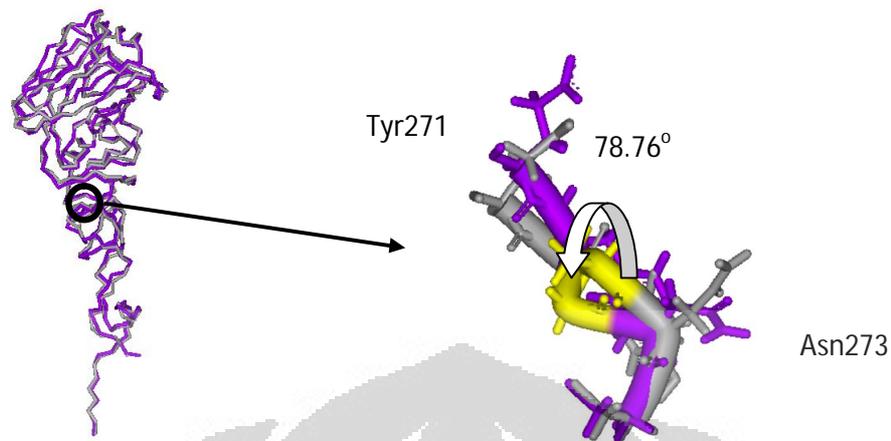
Gambar 5.16 Mutasi T263A. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

m) Mutasi G272S

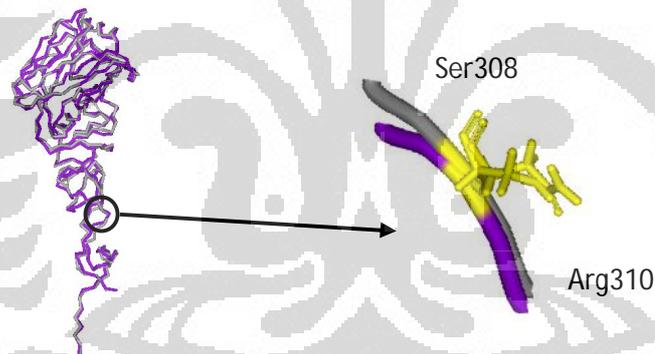
Mutasi pada posisi 272 memperlihatkan mutasi asam amino Glysin, dengan berat molekul 75 Da, menjadi Serin, dengan berat molekul 105 Da. Mutasi pada posisi ini mengakibatkan rantai backbone berrotasi sebesar 78.76° . Di samping hal itu perhitungan energi ikat pada posisi 272 memperlihatkan kenaikan energi ikat sebesar 40.05 kcal/mol.

n) Mutasi N309S

Mutasi terakhir adalah pada posisi 309 dimana asam amino Asparagin, dengan berat molekul 133 Da, menjadi Serin, dengan berat molekul 105 Da. Mutasi ini menyebabkan adanya pergeseran sebesar 0.63 \AA . Pada posisi mutasi ini juga diamati bahwa energi ikat posisi 309 turun sebesar 35.8 kcal/mol.



Gambar 5.17 Mutasi G272S. 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu). Rantai backbone asam amino yang mengalami mutasi berputar sebesar 78° .



Gambar 5.18 Mutasi N309S (kuning). 2IBX (ungu) di-fitting dengan CDC (abu – abu).

5.1.3. Antibodi - 8H5

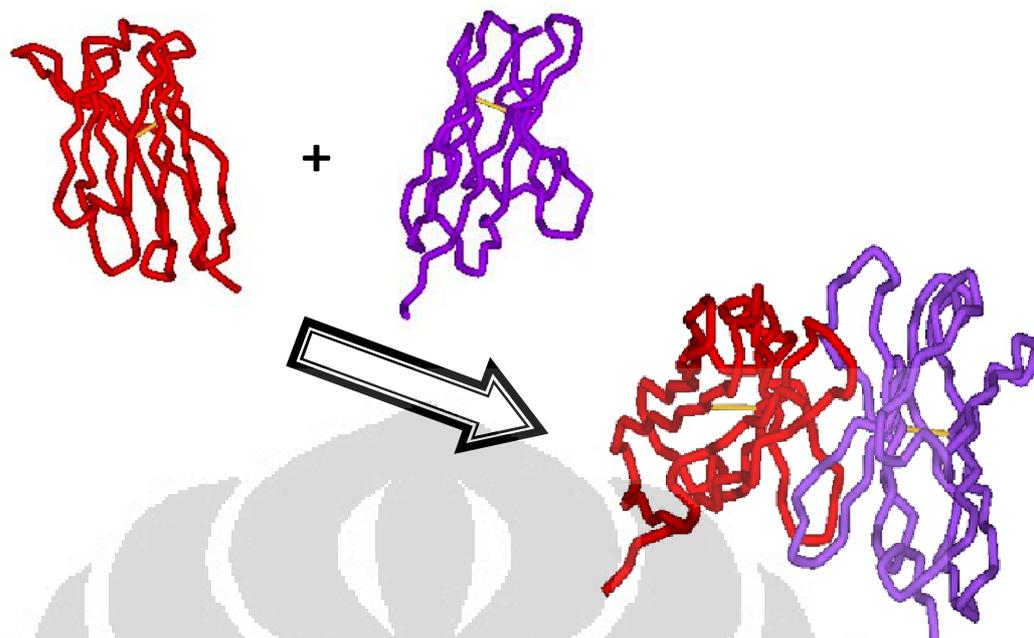
Struktur biomolekul ketiga yang akan digenerasikan dalam penelitian ini merupakan struktur molekul antibodi. Peran antibodi dalam penelitian ini sangat signifikan. Dalam sistem imun tubuh, salah satu upaya tubuh untuk menangkal virus merusak tubuh manusia adalah dengan menetralkan virus dengan antibodi. Upaya menetralkan virus dengan antibodi dimodelkan dan disimulasikan dalam

penelitian ini. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini dinamakan antibodi 8H5. Monoklonal antibodi 8H5 dikultur di laboratorium Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Cina. Sekuens asam amino untuk daerah variabel dipindai dan diverifikasi oleh BoYa Co. di Shanghai, Cina. Menurut Yan et al. (2008) antibodi ini telah dilaporkan bisa menetralsir 46 virus H5N1 dari strain yang berbeda. Yan et al. juga meneliti, secara komputasional, bahwa antibodi 8H5 dapat menyebabkan munculnya epitope netralisasi antara tiga struktur HA yang berbeda, yaitu struktur molekul HA dengan kode 2ibx, 2fk0, dan 1j5m. Tujuan mengapa penelitian ini menggunakan antibodi 8H5 adalah untuk mengetahui apakah 8H5 juga bisa menyebabkan munculnya epitope netralisasi pada struktur HA asal Indonesia (CDC).

Variabel Light antibodi 8H5 (VL) terdiri dari 109 asam amino sementara *Variabel Heavy* (VH) antibodi 8H5 terdiri dari 120 asam amino. Sekuens asam amino VL adalah EIVLTQSPAIMASLGEKVTMSCRASSSVNFVYWYQQRS DASPKLLIYYSSNLAPGVPPRFSGSGSGNSYSLTISGLEGEDAATYYCQ HFTSSPYTFGGGTKLEIKRLE; sekuens asam amino untuk VH adalah QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWIKQRPGHGLEWIG EILPGSDRTNYNGKFKGKATFTADTSSNTAHMQLSSLTSEDSAVYYCANR YDYYFGLDYWGQGTSVTVSS. Daerah antibodi yang digunakan dalam perhitungan penelitian ini hanya domain variabel (lihat subbab 2.2). Hal ini dibenarkan sebab bagian antibodi yang berinteraksi langsung dengan HA virus H5N1 adalah bagian variabel antibodi. Dengan adanya pembatasan tersebut dalam penelitian ini maka komputasi tidak akan terlalu berat.

Struktur 3-D 8H5 belum pernah dipindai secara XRD maupun NMR sehingga homology modeling digunakan untuk menggenerasikan struktur 3D 8H5. Untuk mendapatkan template yang layak dan menggenerasikan struktur berdasarkan template tersebut maka masing – masing sekuens asam amino VL dan VH dimasukkan ke dalam server Swiss Model untuk diproses. Server Swiss model menggenerasikan struktur VL berdasarkan template VL 2BRR (dengan 75.3% kemiripan) sedangkan VH digenerasikan berdasarkan template VH 1D5I

(dengan 87.5% kemiripan). Struktur yang digenerasikan server Swiss Model mungkin belum optimal sehingga optimisasi dilakukan terhadap kedua struktur VL dan VH. Dengan meminimisasi struktur variabel secara terpisah didapatkan bahwa energi untuk VL -6365.24 kcal/mol dan VH -7316.12 kcal/mol. Langkah selanjutnya adalah untuk menggabungkan VL dan VH supaya menjadi fragmen variabel. Penggabungan VL dan VH sebagai satu kesatuan yang dinamakan fragmen variabel dilakukan pada server Rosetta Antibody Prediction Server (<http://antibody.graylab.jhu.edu/>). Server Rosetta memprediksikan struktur fragmen variabel (Fv) antibodi yang memungkinkan dengan memasukkan struktur VL dan VH pada server Rosetta. Struktur fragmen variabel tergenerasi namun optimisasi tidak dilakukan oleh server Rosetta sehingga struktur fragmen variabel yang baru tergenerasi dilakukan optimisasi. Dengan meminimisasi struktur ini didapatkan bahwa energi sistem adalah -14328.24 kcal/mol. Energi fragmen variabel utuh ternyata lebih minim dibandingkan dengan penjumlahan energi VL dan VH. Selisih antara energi fragmen variabel dan hasil penjumlahan energi VH dan VL sebesar 646.88 kcal/mol. Hilangnya energi saat penggabungan VL dan VH menjadi fragmen variabel menandakan fragmen variabel 8H5 menjadi lebih stabil setelah penggabungan VL dan VH. "Energy loss" yang telah disebutkan di atas juga mengindikasikan bahwa penggabungan VL dan VH menjadi fragmen variabel dipicu oleh energi bebas. Dengan data energi di atas maka secara energetik, struktur 3-D fragmen variabel 8H5 cukup valid.



Gambar 5.19 Struktur 3D Fragmen variabel (Fv) 8H5 (merah menandakan variabel heavy, ungu menandakan variabel light, garis emas menandakan ikatan disulfida).

Selain energi sistem data – data yang bersifat struktural juga harus bisa menegaskan bahwa struktur 3-D fragmen variabel 8H5 valid. Modul Profile 3-D dalam piranti lunak Discovery Studio 2.1 digunakan dalam penelitian ini untuk verifikasi struktur protein yang terbentuk. Profile 3-D memeriksa kesesuaian suatu struktur 3-D molekul protein berdasarkan data – data struktur yang diketahui dengan sekuens yang berhubungan dalam database Discovery Studio 2.1. Berdasarkan hal tersebut maka Profile 3-D akan menilai struktur 3-D fragmen variabel 8H5. Nilai – nilai yang ditunjukkan adalah nilai minimum milik struktur 3-D fragmen variabel 8H5 dan nilai struktur 3-D fragmen variabel 8H5 sesungguhnya yang telah dinilai Profile 3-D. Nilai minimum ditunjukkan oleh Profile 3-D untuk menandakan batas minimum nilai yang mengindikasikan validitas struktur fragmen variabel 8H5. Bila nilai struktur sesungguhnya di bawah nilai minimum tersebut maka struktur 3-D yang dinilai tersebut tidak valid. Nilai kesesuaian protein fragmen variabel 8H5 yang dihitung adalah 103.065. Profile 3-D menyatakan bahwa untuk suatu struktur sebesar ini, nilai terendah adalah 46.379. Namun yang didapatkan adalah nilai yang jauh di atas nilai

minimum tersebut sehingga struktur fragmen variabel 8H5 cukup layak secara struktural.

Selebihnya salah satu aspek yang harus diperhitungkan untuk memverifikasi struktur fragmen variabel adalah dengan mengamati *solvent accessible surface* (SAS) struktur fragmen variabel 8H5. VH secara individu memiliki SAS sebesar 6.598 \AA^2 dan VL memiliki SAS sebesar 6.113 \AA^2 . Setelah penggabungan VL dan VH menjadi fragmen variabel, didapatkan bahwa SAS fragmen variabel 8H5 sebesar 10.932 \AA^2 . Selisih SAS antara penjumlahan SAS VH dan VL dengan SAS fragmen variabel 8H5 adalah 1.779 \AA^2 . Berdasarkan hasil ini struktur fragmen variabel 8H5 yang dimodelkan cukup baik karena selisih SAS setelah penggabungan mendekati 1800 \AA^2 (Chothia et al., 1985). Chothia et al. mengamati penggabungan VH dan VL dari tiga macam antibodi dan didapatkan bahwa selisih SAS setelah penggabungan VH dan VL menjadi fragmen variabel kurang lebih sebesar 1800 \AA^2 dan menurut Chothia et al. nilai ini akan sama untuk semua macam antibodi.

5.2 Molecular Docking

Proses yang signifikan dalam penelitian ini merupakan *molecular docking*. *Molecular docking* digunakan sebagai proses awal untuk mempelajari interaksi protein–protein, khususnya antigen–antibodi, secara mendalam. *Molecular docking* dilakukan untuk membentuk kompleks 8H5–HA. Proses docking dalam penelitian ini bertujuan untuk membentuk kompleks 8H5–HA. Selebihnya, tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengamati epitope netralisasi suatu molekul HA. Ingat bahwa antibodi mengikat HA pada bagian dimana HA seharusnya berikatan dengan sel yang akan diinfeksi. Jika *steric hindrance* (penghalangan secara spasial) terjadi pada bagian HA yang seharusnya berikatan dengan sel maka HA bisa dibilang ternetralisir. Daerah dimana *steric hindrance* terjadi dan mengakibatkan netralisasi antigen dinamakan epitope netralisasi. Untuk mengamati neutralising HA yang berbeda dalam penelitian ini maka docking dilakukan secara terpisah untuk HA 2IBX dan CDC sehingga kompleks – kompleks yang akan dihasilkan adalah kompleks 8H5 – 2ibx dan kompleks 8H5 – CDC.

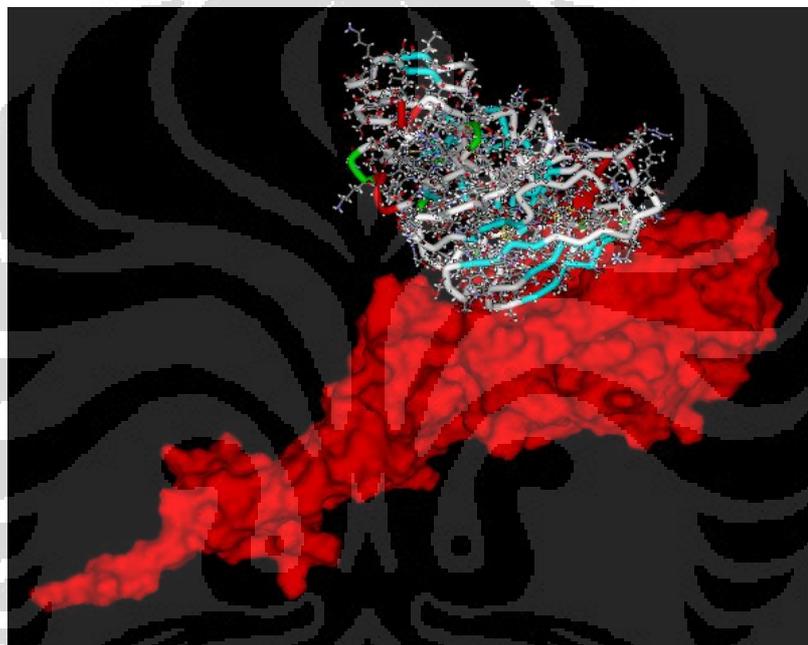
Dalam penelitian ini *molecular docking* antara antibodi 8H5 dengan HA virus asal Vietnam 2ibx dan HA virus asal Indonesia CDC dilakukan dengan menggunakan piranti lunak Discovery studio 2.1. *Molecular docking* yang terdapat pada Discovery Studio 2.1 terdiri dari dua proses yang direpresentasikan oleh dua modul. Proses dan modul pertama yang digunakan adalah ZDock untuk penggabungan molekul HA dan 8H5 menjadi satu kompleks, sedangkan proses dan modul kedua yang digunakan untuk eksekusi *molecular docking* adalah RDock yang digunakan khusus untuk *structural refinement* kompleks molekul yang dihasilkan ZDock.

Satu hal yang perlu diperhatikan sebelum melakukan proses *docking* adalah untuk menkarakterisasi molekul – molekul yang akan melalui *docking* dengan suatu medan gaya. Tanpa adanya medan gaya yang dapat mengkarakterisasi molekul – molekul maka proses *docking* tidak dapat dijalankan sebab medan gaya mendefinisikan komponen energi potensial apa saja yang dialami oleh sistem sehingga interaksi yang mungkin terjadi antara HA dan 8H5 bisa diperhitungkan. Sebelum proses *docking* dilakukan, medan gaya CharmM diaplikasikan kepada tiap protein sebagai medan gaya yang dialami struktur HA dan 8H5. Setelah mengkarakterisasi struktur molekul – molekul dengan medan gaya maka *docking* dapat dilaksanakan.

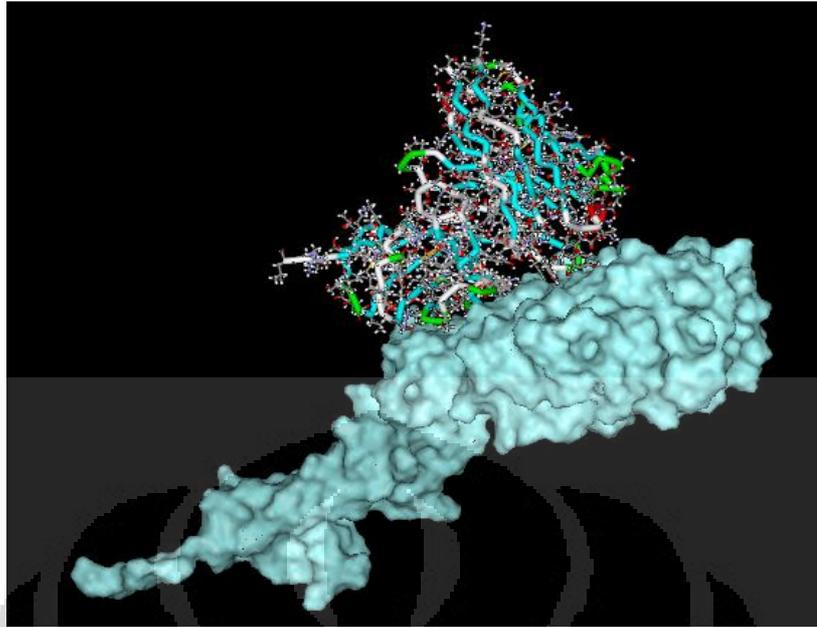
Dalam modul pertama, antibodi berperan sebagai protein reseptor sementara HA berperan sebagai ligand. Perbedaan mendasar antara ligand dan reseptor adalah perannya. Ligand merupakan molekul protein yang berfungsi mencari posisi terbaik dalam pembentukan struktur gabungan antibodi-virus, sedangkan 8H5 berada dalam posisi yang tetap. Dalam mencari posisi interaksi yang baik serta waktu komputasi yang tidak terlalu lama namun tetap akurat dalam perhitungan ini digunakan parameter *angular step size* 15. *Angular step size* dengan nilai 15 berarti HA merubah posisinya setiap 15 derajat untuk mendapatkan posisi yang optimal. Selain hal – hal yang telah disebutkan, parameter yang juga digunakan adalah pengabaian residu asam amino dalam interaksi. Residu asam amino yang diabaikan dari interaksi adalah residu – residu asam amino pada 8H5, yaitu Leu109 (Rantai L) dan Ser112 (Rantai H). Kedua residu tersebut diblokir dari

interaksi karena kedua asam amino tersebut seharusnya bersambung dengan Fragmen *Crystallisable* (Fc) antibodi. Interaksi yang sangat efektif antara virus dan antibodi terjadi pada bagian variabel antibodi. Oleh karena itu dalam molecular docking hanya bagian variabelnya saja yang diperhitungkan sedangkan bagian Fc dan residu asam amino Leu 109 dan Ser 112 yang berikatan dengan Fc diabaikan.

Hasil dari molecular docking 8H5 dengan HA 2IBX dan CDC adalah sebagai berikut:

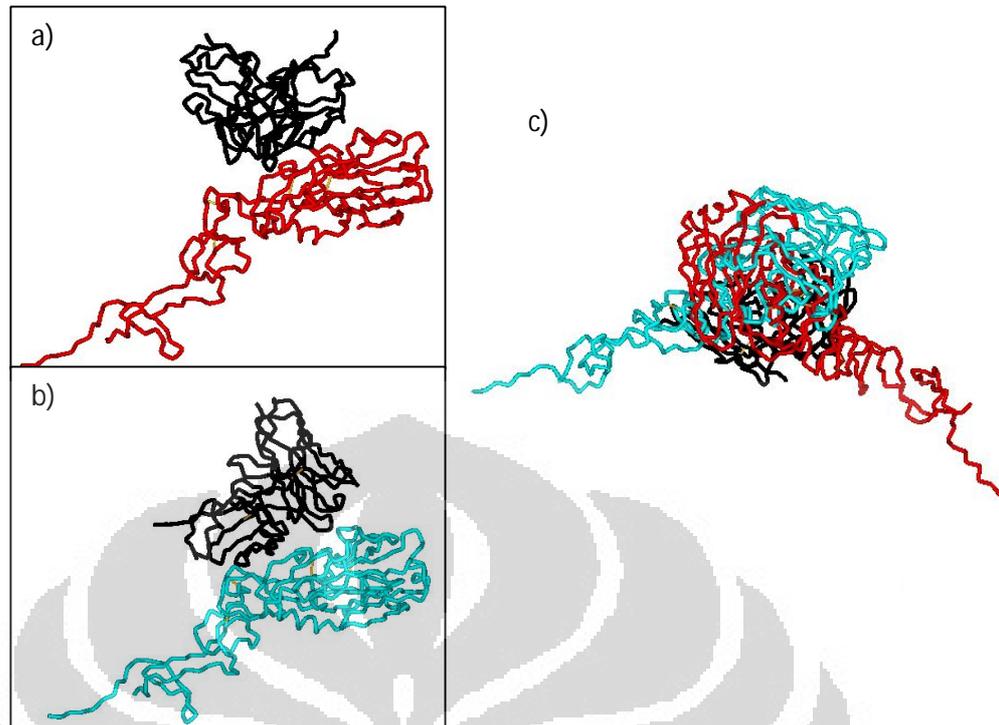


Gambar 5.21 Kompleks 8H5 – 2IBX. 2IBX digambarkan dengan memperlihatkan SAS berwarna merah.



Gambar 5.22 Kompleks 8H5 – CDC. CDC digambarkan dengan memperlihatkan SAS berwarna biru.

Gambar 5.21 dan 5.22 memperlihatkan hasil interaksi struktur gabungan 8H5 dengan 2IBX dan CDC. Dari kedua gambar tersebut terlihat bahwa interaksi antara 8H5 dan 2IBX begitupula antara 8H5 dan CDC berada pada lokasi yang sama, tetapi dengan orientasi yang berbeda seperti yang terlihat pada Gambar 5.23.



Gambar 5.23 (a) Kompleks 8H5-2IBX. Rantai backbone biomolekul dalam kompleks divisualisasikan sebagai kawat tebal. 8H5 ditunjukkan oleh warna hitam sementara 2ibx ditunjukkan oleh warna merah.(b) Kompleks 8H5 – CDC. 8H5 ditunjukkan oleh warna hitam sementara CDC ditunjukkan oleh warna biru.(c)kompleks 8H5-2IBX yang di-fitting dengan 8H5 - CDC. 8H5 berwarna hitam, 2IBX berwarna merah, dan CDC berwarna biru.8H5 berada di posisi yang sama saat fitting.

Untuk mengkonfirmasi hasil perhitungan apakah antibodi (8H5) dapat menghambat virus (HA) maka analisis perubahan (Δ SAS) dilakukan terhadap kedua kompleks tersebut. Analisis Δ SAS merupakan metode analisis yang bersifat struktural dan sering digunakan dalam penelitian yang berhubungan dengan daerah interaksi atau situs aktif suatu biomolekul. Δ SAS didefinisikan sebagai selisih antara SAS HA sebelum molecular docking (SAS pra-docking) dan setelah molecular docking (SAS pasca-docking).

$$\Delta\text{SAS} = \text{SAS}_{\text{pra-docking}} - \text{SAS}_{\text{pasca-docking}}$$

Δ SAS yang diamati adalah SAS pada daerah interaksi 8H5 – HA. Δ SAS positif berarti asam amino yang interaksi asam amino yang terdapat pada virus dan

antibodi sangat kuat sehingga kemungkinan terjadinya infeksi berkurang. Hasil perhitungan Δ SAS pada daerah interaksi 8H5 – 2ibx dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Yan et al. suatu residu asam amino yang termasuk dalam epitope netralisasi adalah asam amino dengan Δ SAS lebih besar atau sama dengan 7 \AA^2 [11]. Dengan teknik perhitungan semacam ini Yan et al. mendapatkan 24 asam amino yang termasuk asam amino pembentuk epitope netralisasi pada struktur molekul 2ibx.

Hal paling mendasar antara penelitian ini dan penelitian Yan et al. adalah medan gaya yang diterapkan kepada model molekul. Yan et al. menggunakan Consistent Valence Force Field (CVFF) dan dalam penelitian ini menerapkan medan gaya CharmM. Pada CVFF suku energi tambahan adalah suku energi yang diakibatkan oleh kopling suku energi antar ikatan, ikatan – sudut, antar sudut, sudut valensi – sudut torsi. Sementara suku energi tambahan pada CharmM adalah pada suku energi *out-of-plane bending* dan suku energi Urey-Bradley yang menandakan dilasi dan kontraksi struktur triatomik. Adanya perbedaan ekspresi energi menyebabkan karakteristik geometri struktural yang tidak sama dengan konsekuensi nilai energi sistem yang tidak sama juga. Pengaruh medan gaya terletak pada pencarian posisi HA terhadap 8H5. HA sebagai ligand diharuskan mengakomodasi bentuk reseptor 8H5. Supaya ligand dapat mengakomodasi bentuk reseptor, ligand harus menyesuaikan bentuknya terhadap reseptor yang kaku. Penyesuaian yang terjadi berarti ada pergerakan dalam struktur ligand. Pergerakan yang dimaksud bisa berupa pembengkokan rantai *backbone* dan rotasi rantai – rantai samping dengan semua pergerakan yang dilakukan ligand mengikuti persamaan – persamaan medan gaya. Penggunaan medan gaya yang berbeda pada model yang diteliti dapat menyebabkan perbedaan hasil molecular docking.

Tabel 5.2 Δ SAS 2IBX

No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)	No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)
1	ASP72	47.107	12	SER124	47.187
2	GLU73	91.457	13	SER125	7.58
3	ILE75	62.753	14	SER137	12.021
4	ASN76	102.167	15	ALA138	17.571
5	VAL77	16.78	16	TYR141	75.916
6	HIS114	9.806	17	GLN142	89.322
7	GLU116	65.302	18	GLY143	15.677
8	LYS117	33.967	19	LYS144	35.527
9	ILE118	15.044	20	SER146	16.094
10	GLN119	83.468	21	ARG149	52.001
11	LYS123	22.065	22	TYR256	63.369

Dengan demikian, berdasarkan penelitian Yan et al., maka 22 asam amino hasil molecular docking pada penelitian ini dapat diharapkan sebagai epitope netralisasi.

Tabel 5.3 Δ SAS CDC

No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)	No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)
1	ASP84	32.379	11	VAL147	15.263
2	ASN88	65.607	12	PRO152	11.533
3	VAL89	27.244	13	TYR153	51.764
4	PRO90	85.524	14	LEU154	28.804
5	GLU91	9.401	15	GLY155	18.976
6	GLU97	6.973	16	SER156	8.156
7	ASN112	16.314	17	SER158	12.7
8	ILE132	28.305	18	ARG161	35.498
9	ILE133	8.491	19	GLU267	12.787
10	SER136	32.5	20	TYR268	40.383

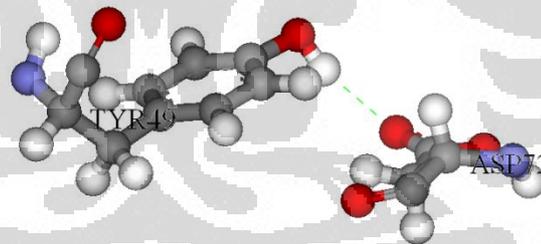
Tabel 5.3 memperlihatkan hasil perhitungan Δ SAS hasil interaksi antibodi (8H5) dengan HA virus asal Indonesia (CDC), pada kompleks 8H5 – CDC. Dari tabel terlihat bahwa kompleks 8H5 – CDC ini tidak menghasilkan kandidat asam amino pembentuk epitope netralisasi sebanyak 2IBX. Hal ini diperkirakan karena adanya 12 mutasi asam amino pada sekuens asam amino CDC dari posisi 84 hingga 268 sehingga mengakibatkan interaksi antara 8H5 dan HA pada virus CDC berbeda. Hal ini juga dapat dilihat pada Gambar 5.23 dimana orientasi interaksi antara 8H5 dan HA masing – masing virus. Walaupun demikian, kandidat asam amino pembentuk epitope netralisasi yang ekuivalen antara kedua model HA didapatkan.

Molecular docking antara 8H5 dan HA tidak hanya menyebabkan adanya perubahan SAS HA tetapi juga mengakibatkan ikatan hidrogen terbentuk antara HA dengan 8H5. Ikatan hidrogen merupakan satu – satunya ikatan yang terjadi secara intermolekuler. Ikatan hidrogen secara umum berguna untuk menjaga kestabilan suatu struktur protein. Agar kompleks 8H5 – HA berikatan maka ikatan hidrogen pada daerah interaksi 8H5 – HA seharusnya terbentuk oleh asam amino pada 8H5 dengan asam amino kandidat epitope netralisasi HA.

Ikatan hidrogen yang terbentuk antara 8H5 dan HA akan diperlihatkan pada gambar – gambar di bawah. Perbedaan atom penyusun asam amino diperlihatkan dengan perbedaan warna. Atom karbon berwarna abu – abu, atom atom nitrogen berwarna biru, atom oksigen berwarna merah, dan atom hidrogen berwarna putih.

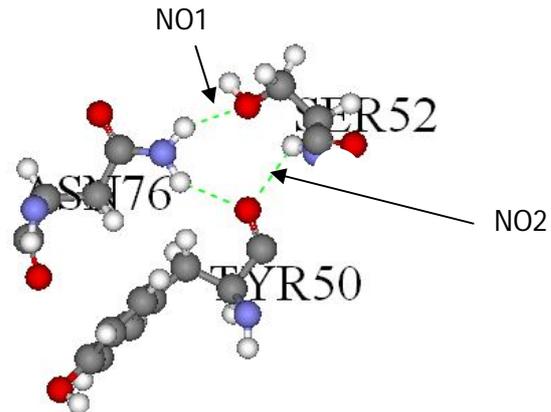
Ikatan hidrogen yang dihasilkan oleh *molecular docking* 8H5 dengan 2ibx adalah:

- Asp72 dengan rantai Tyr49 rantai Light (L) 8H5. Panjang ikatan hidrogen sebesar 2.25 Å.



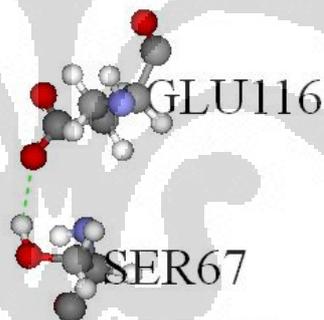
Gambar 5.24 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus OH Asp72 dengan gugus OC Tyr49 rantai L.

- Asn76 dengan Tyr50 dan Ser52 rantai L 8H5. Panjang ikatan hidrogen terhadap Tyr50 2.2 Å dan Ser52 2.01 Å.



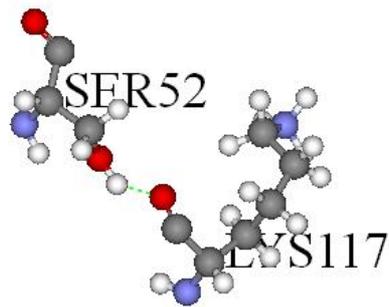
Gambar 5.25 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asn76 dengan Tyr50 dan Ser52 rantai L 8H5. Gugus NO1Asn76 2ibx membentuk ikatan hidrogen dengan Gugus CO Tyr50 rantai L 8H5. Gugus NO2 membentuk ikatan hidrogen dengan COH Ser 52 rantai L 8H5. (Angka setelah nama atom hanya untuk pembeda saja)

- Glu116 dengan rantai Ser67 rantai L. Panjang ikatan hidrogen sebesar 2.43 Å.



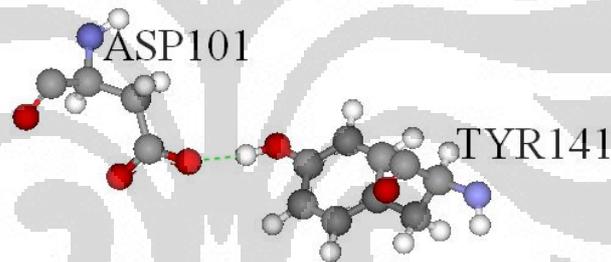
Gambar 5.26 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Glu116 dengan Ser67 rantai L 8H5.

- Lys117 dengan rantai Ser52 rantai L. Panjang ikatan hidrogen sebesar 1.93 Å.



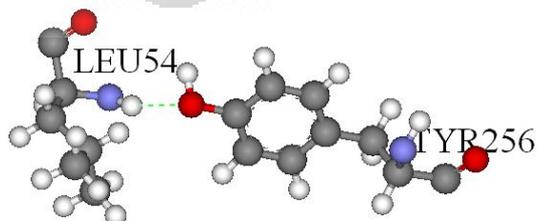
Gambar 5.27 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Lys117 dengan Ser52 rantai L 8H5.

- Tyr141 dengan rantai Asp101 rantai H 8H5. Panjang ikatan hidrogen sebesar 2.16 Å.



Gambar 5.28 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr141 dengan Asp101 rantai H 8H5.

- Tyr256 dengan rantai Leu54 rantai L. Panjang ikatan hidrogen sebesar 2.29 Å.

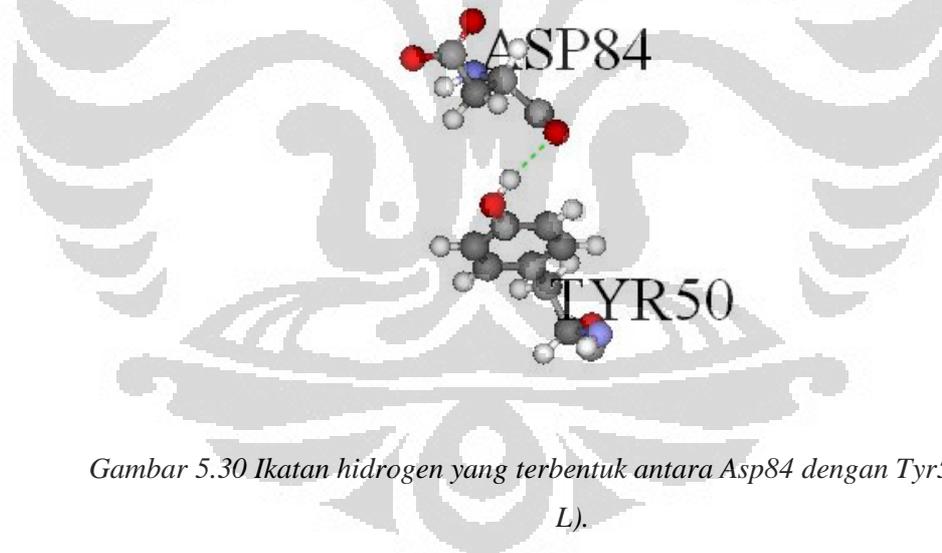


Gambar 5.29 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr256 dengan Leu54 rantai L 8H5.

Dari gambar – gambar di atas terlihat bahwa *molecular docking* antara 8H5 dan 2ibx menghasilkan tujuh ikatan hidrogen. Hasil ini berbeda dengan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk oleh *molecular docking* yang dilakukan Yan et al. (2008). Yan et al. mendapatkan delapan ikatan hidrogen yang terbentuk antara 2ibx dan 8H5. Asam amino yang berkontribusi terhadap ikatan hidrogen pun berbeda dengan penelitian ini kecuali asam amino Asn 76 dan Lys117. Sama dengan perbedaan Δ SAS perbedaan pembentukan ikatan hidrogen dapat disebabkan oleh medan gaya yang digunakan untuk mengkarakterisasi molekul – molekul sebelum proses docking.

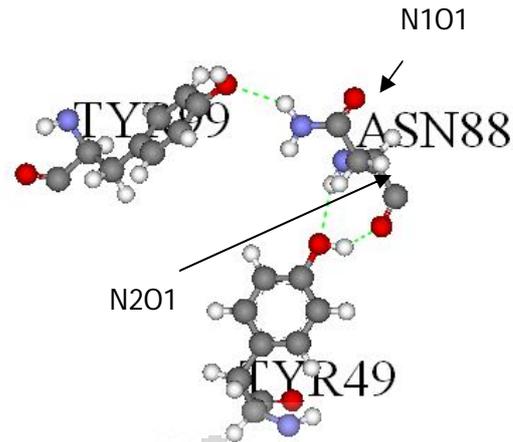
Pada CDC, kandidat epitope yang berkontribusi terhadap terbentuknya ikatan hidrogen dengan 8H5 merupakan:

- Asp84 dengan Tyr50 rantai L. Panjang ikatan hidrogen sebesar 2.28 Å.



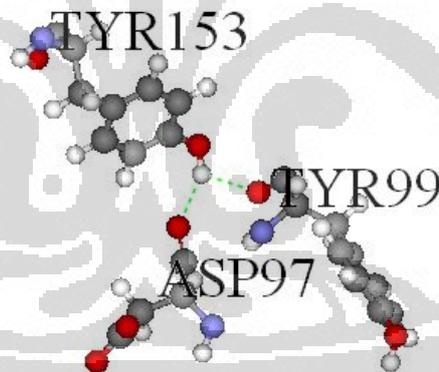
Gambar 5.30 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asp84 dengan Tyr50 (rantai L).

- Asn88 dengan Tyr 49 rantai L, dan Tyr99 rantai H. Panjang ikatan hidrogen terhadap Tyr49 1.82 Å dan Tyr99 2.24 Å.



Gambar 5.31 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Asn88 dengan Tyr49 rantai L dan Tyr99 rantai H. Gugus N101 Asn88 membentuk ikatan hidrogen dengan gugus OH Tyr99. Gugus N201 Asn 88 membentuk ikatan hidrogen dengan gugus OH Tyr49. Gugus CO Asn 88 membentuk ikatan hidrogen dengan gugus OH Tyr49.

- Tyr153 dengan Asp97 dan Tyr99 rantai H 8H5. Panjang ikatan hidrogen terhadap Asp97 1.95 Å dan Tyr99 2.07 Å.

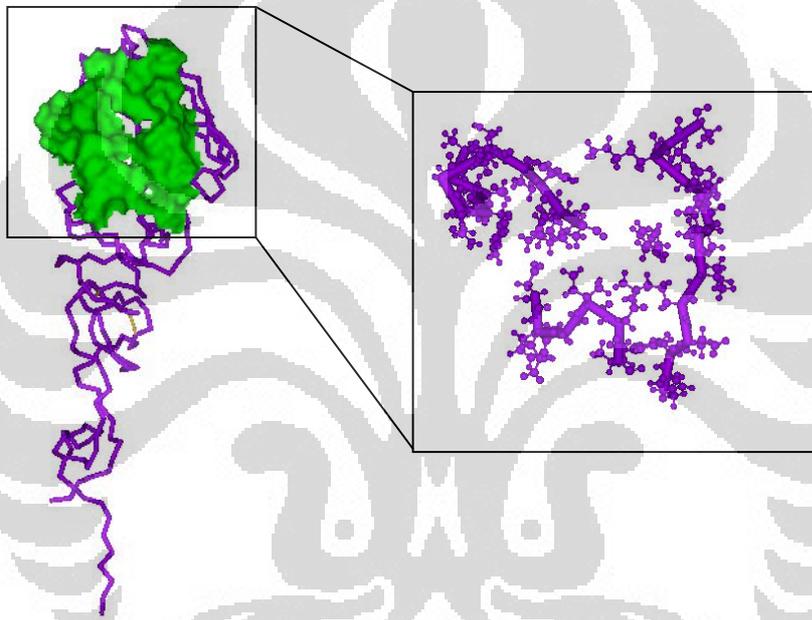


Gambar 5.32 Ikatan hidrogen yang terbentuk antara Tyr153 dengan Asp 97 dan Tyr99 rantai H. Gugus OH Tyr153 membentuk ikatan dengan gugus CO Tyr 99 dan juga gugus CO Asp97.

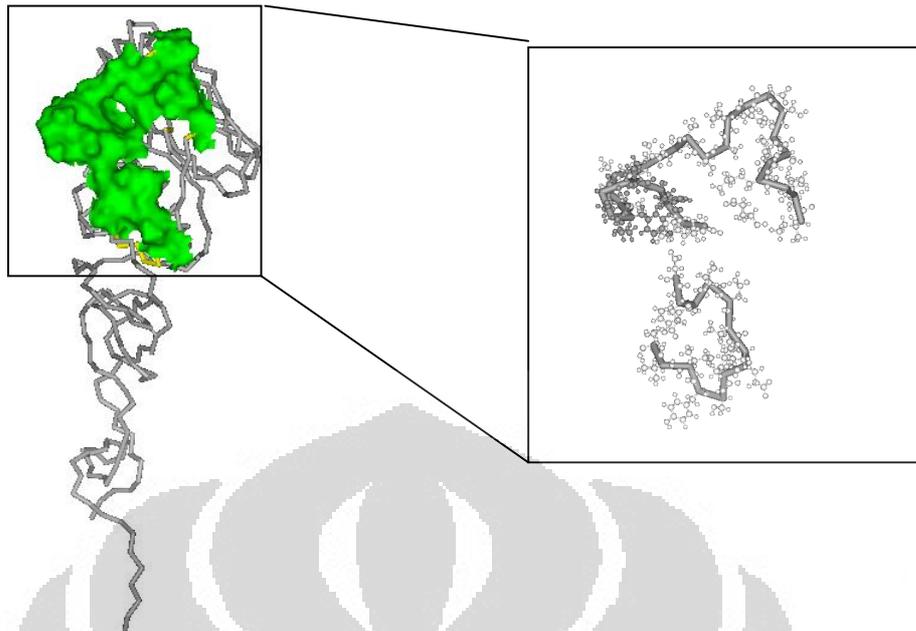
Berdasarkan gambar – gambar di atas (Gambar 5.30-32) molecular docking antara 8H5 dan CDC menghasilkan enam ikatan hidrogen. Pada CDC, Asn88 membentuk ikatan hidrogen dengan beberapa residu dari rantai L dan H 8H5. Asn88 sendiri ekuivalen dengan Asn 76 pada 2IBX yang membentuk ikatan hidrogen dengan Tyr50 dan Ser52 pada rantai L. Ikatan hidrogen muncul pada residu CDC dan 2IBX yang ekuivalen, namun pasangannya adalah residu 8H5

yang berbeda. Ini menjelaskan kemiripan formasi docking yang serupa namun orientasi pengikatan/penghambatan yang berbeda.

Berdasarkan data ikatan hidrogen dan hasil perhitungan Δ SAS yang telah dipaparkan di atas maka epitope netralisasi kini akan didefinisikan. Epitope netralisasi masing – masing HA akan didefinisikan sebagai asam amino yang terpengaruh secara langsung oleh adanya 8H5. Pengaruh langsung tersebut berupa perubahan Δ SAS dan juga pembentukan ikatan hidrogen dengan asam amino 8H5.



Gambar 5.33 Permukaan molekul (hijau) 2ibx yang didefinisikan sebagai epitope netralisasi. Asam amino pembentuk epitope netralisasi diperlihatkan pada inset.



Gambar 5.34 Permukaan molekul (hijau) CDC yang didefinisikan sebagai epitope netralisasi. Asam amino pembentuk epitope netralisasi diperlihatkan pada inset.

5.3 Simulasi Dinamika Molekuler (SDM)

Pada subbab sebelumnya dijelaskan mengenai peran *molecular docking* dan dari proses tersebut epitope netralisasi masing – masing HA asal Vietnam (2ibx) dan Indonesia (CDC) telah didefinisikan. *Molecular docking* menggambarkan suatu interaksi yang terjadi antara HA dengan antibodi 8H5 dalam keadaan yang diam. Namun pada kenyataannya biomolekul pada umumnya tidak berada dalam keadaan yang selalu diam. Interaksi lebih lanjut antara HA dan 8H5 dapat diamati dengan mempergunakan simulasi dinamika molekuler (SDM). SDM dapat menggambarkan bagaimana atom – atom atau molekul dalam suatu sistem berinteraksi begitupula dinamika interaksi atom – atom penyusun selama waktu yang dapat ditentukan. Pada bagian penelitian ini SDM digunakan untuk mengamati dinamika interaksi atom dalam sistem serta pengaruhnya terhadap struktur kompleks 8H5-HA secara global serta perubahan yang mungkin terjadi pada epitope netralisasi, dihasilkan pada perhitungan pada subbab *Molecular Docking*.

Optimalisasi struktur epitope netralisasi perlu untuk dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan SDM. Epitope netralisasi merupakan situs aktif tempat terjadinya interaksi intermolekuler yang juga memperhatikan interaksi

elektronik antar molekul. Optimisasi struktur elektronik epitope netralisasi dilakukan dengan meminimisasi energi sistem dengan metode Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics (QM/MM) yang menggunakan fungsional *exchange correlation* BLYP.

Minimisasi hasil perhitungan dengan mempergunakan metode QM/MM pada sistem epitope netralisasi menghasilkan energi epitope 2IBX sebesar -14759.788 kcal/mol sementara energi epitope CDC sebesar -12872.594 kcal/mol. Perbedaan energi ini dapat disebabkan oleh perbedaan jumlah asam amino pembentuk epitope netralisasi dimana epitope 2ibx terbentuk oleh asam amino yang lebih banyak daripada epitope CDC. Jika energi sistem dikaitkan dengan jumlah asam amino pembentuk epitope netralisasi maka dapat dikatakan bahwa energi sistem akan berkurang seiring bertambahnya jumlah asam amino pembentuk epitope netralisasi. Hasil minimisasi struktur epitope netralisasi sayangnya tidak dapat dibandingkan dengan penelitian – penelitian lain karena kurangnya dokumentasi penelitian yang menggunakan teknik demikian pada sistem yang serupa.

Setelah mendapatkan struktur optimal dari epitope netralisasi, SDM dapat dilakukan. SDM dalam penelitian ini meliputi dua sistem. Sistem pertama adalah kompleks 8H5-2ibx dan sistem kedua adalah kompleks 8H5 – CDC. Dua sistem tersebut berada dalam medan gaya CharmM sebelum simulasi dilakukan untuk menentukan komponen energi potensial apa saja yang akan diperhitungkan.

Tabel 5.4 menunjukkan parameter – parameter yang digunakan dalam simulasi. Simulasi yang dilakukan diupayakan menyerupai kondisi nyata dalam laboratorium. Salah satu pendekatan terhadap kondisi nyata adalah penetapan temperatur simulasi. Tabel 5.4 memperlihatkan bahwa temperatur awal sistem ditetapkan pada 0K sementara target temperatur akhir adalah 300K. Alasan mengapa sistem dipanaskan dan tidak langsung disimulasikan pada temperatur 300 K adalah karena struktur kompleks 8H5 – HA telah melalui minimisasi energi. Minimisasi energi menghasilkan energi sistem yang paling minimum dengan atom – atom penyusun molekul dalam keadaan diam. Kondisi seperti

demikian secara teoritik hanya dapat dicapai pada temperatur 0 K, yang merupakan temperatur awal simulasi.

Tabel 5.4 Parameter SDM untuk kedua kompleks 8H5-HA

Heating Steps	2000000
Heating Time Step	0.001 ps/step
Heating Initial Temperature	0.0 K
Heating Target Temperature	300.0 K
Implicit Solvent Model	Generalized Born with Molecular Volume (GBMV)
Dielectric Constant	1
Implicit Solvent Dielectric Constant	80
Minimum Hydrogen Radius	1.0 Å
Salt Concentration	0.0
Input Atomic Radii	van der Waals radii
Nonbond List Radius	15.0 Å
Nonbond Higher Cutoff Distance	12.0 Å
Nonbond Lower Cutoff Distance	10.0 Å

Dalam simulasi jumlah langkah yang ditentukan untuk perhitungan simulasi sebanyak $2 \cdot 10^6$ sementara untuk tiap satu langkah tersebut waktu yang berlalu pada simulasi sebesar 0.001 ps. Dengan demikian waktu simulasi secara total sebesar 2000 ps atau 2 ns. Salah satu pendekatan terhadap kondisi nyata adalah penggunaan solvasi implisit karena dalam kenyataan biomolekul berada dalam lingkungan yang cair (*aqueous*). Solvasi dilakukan secara implisit dan bukan eksplisit karena ukuran masing – masing kompleks terdiri lebih dari 1000 asam amino sehingga solvasi secara eksplisit tidak dapat dilakukan karena sumber daya komputasi yang tidak memadai. Maka dari itu solvasi implisit digunakan dengan menggunakan model Generalised Born with Molecular Volume. Pada model ini

konstanta dielektrik lingkungan sistem bernilai 1 (konstanta dielektrik dalam ruang hampa) sedangkan konstanta dielektrik pada volume yang diselimuti oleh permukaan molekul 8H5 dan HA bernilai (konstanta dielektrik dalam medium air).

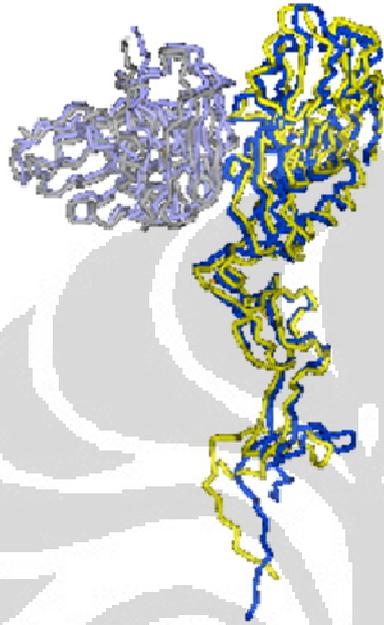
Sistem pertama yang melalui SDM adalah kompleks 8H5-2ibx. Gambar 5.35 (a) memaparkan perbandingan antara struktur rantai *backbone* awal kompleks dan struktur akhir rantai *backbone* kompleks setelah simulasi. Secara keseluruhan struktur akhir kompleks bergeser dari posisi awal. Terlihat dari HA 2ibx awal yang berwarna biru dan HA2ibx akhir berwarna kuning bahwa pergeseran posisi yang terjadi lebih jelas terlihat pada bagian bawah HA yang tidak berinteraksi langsung dengan 8H5. Pada bagian yang tidak berinteraksi tersebut pergeseran struktur lebih dominan dibandingkan bagian HA yang berinteraksi langsung dengan 8H5.

Gambar 5.35(b) memperlihatkan plot *root mean square displacement* (RMSD) terhadap waktu. RMSD menjelaskan pergeseran relatif yang terjadi pada rantai backbone selama simulasi berlangsung. Pada plot RMSD tersebut terlihat bahwa struktur secara keseluruhan terus bergeser dari posisi awalnya. Awal grafik menunjukkan bahwa ada kenaikan RMSD secara drastis dari 0 hingga sekitar 0.75 Å. Kenaikan drastis ini berasal dari pemanasan yang terjadi saat 2 ps pertama simulasi. Tren grafik yang terus naik berarti kompleks terus bergeser menjauhi posisi awal. Namun jika grafik RMSD dikaitkan dengan gambar 5.35(a), pergeseran yang digambarkan oleh grafik tidak terlalu terlihat pada struktur secara keseluruhan kecuali pada HA.

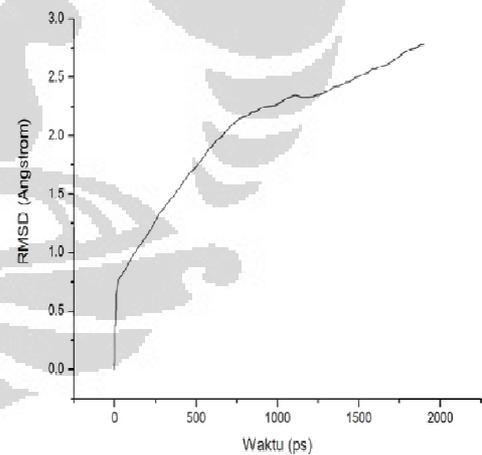
Gambar 5.36(a) memaparkan hasil simulasi struktur rantai *backbone* awal dan struktur rantai *backbone* akhir dari kompleks 8H5-CDC setelah simulasi. Sama halnya dengan kompleks 8H5-2ibx, terlihat adanya pergeseran HA CDC awal yang berwarna hijau ke HA 2ibx akhir berwarna oranye. Begitupula pada kompleks ini pergeseran posisi yang terjadi lebih jelas terlihat pada bagian bawah HA yang tidak berinteraksi langsung dengan 8H5, sementara bagian atas HA masih ada rantai *backbone* yang tumpang tindih antara struktur awal dan akhir

yang mengindikasikan bahwa pergeseran posisi akhir yang tidak terlalu jauh dari posisi awal.

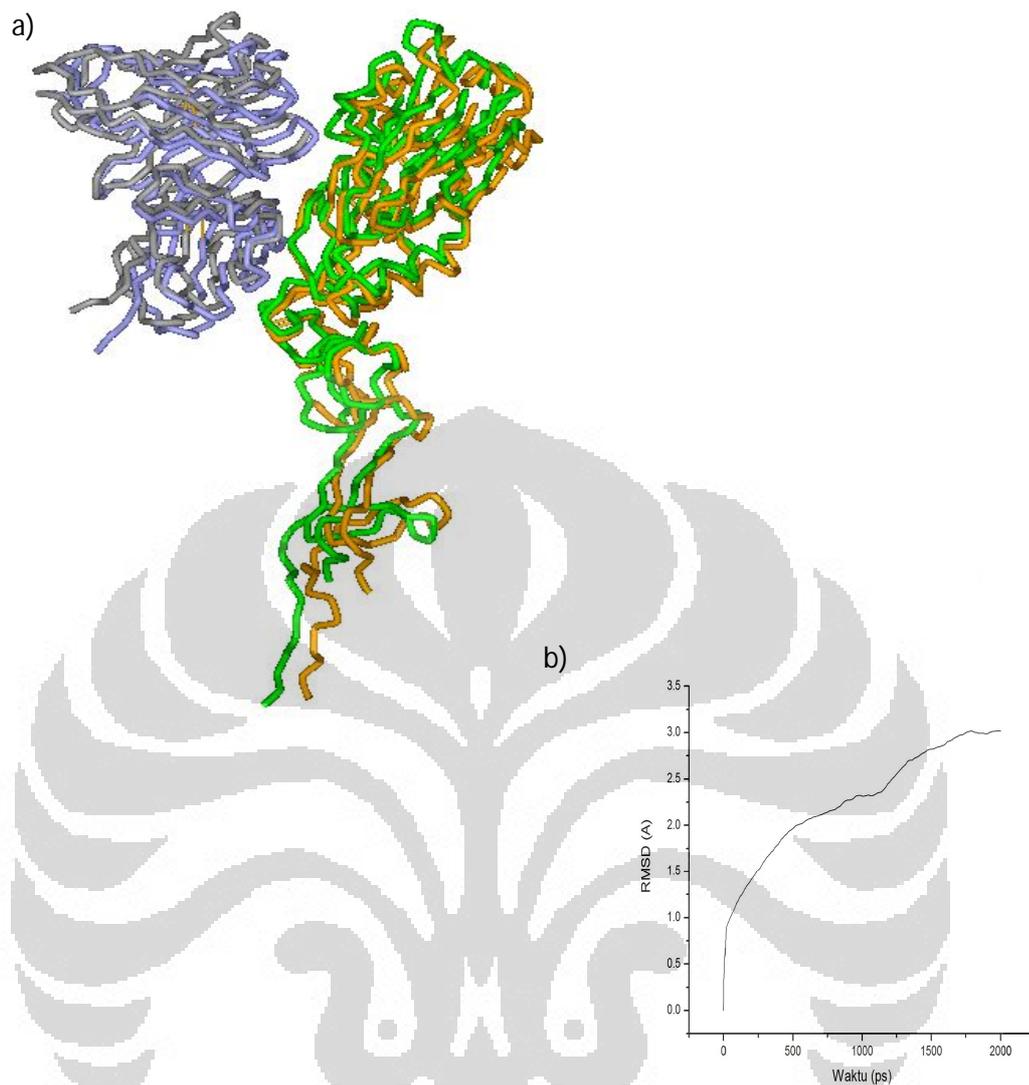
a)



b)



Gambar 5.35 (a) Fitting kompleks 8H5-2ibx sebelum SDM (abu-abu - biru) dan sesudah SDM (ungu mudah - kuning). (b) Plot RMSD kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu.



Gambar 5.36 (a) Fitting kompleks 8H5-2ibx sebelum SDM (abu-abu - hijau) dan sesudah SDM (ungu mudah - oranye). (b) Plot RMSD kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu.

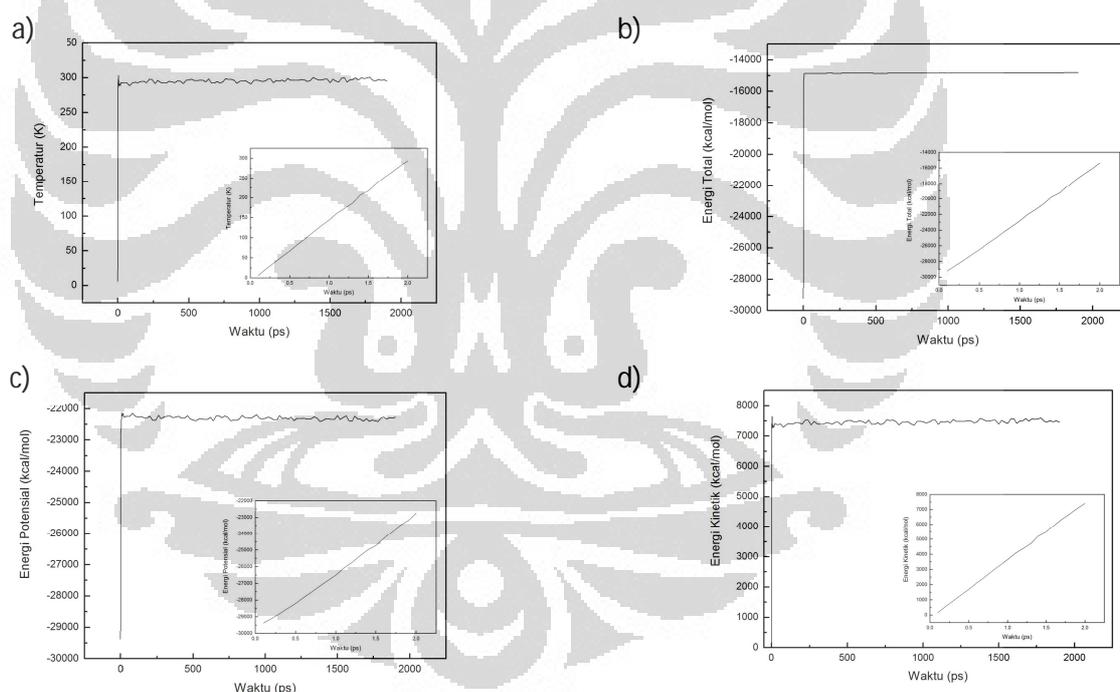
Gambar 5.36(b) memperlihatkan plot *root mean square displacement* (RMSD) kompleks 8H5-CDC terhadap waktu. Awal grafik menunjukkan bahwa ada kenaikan RMSD secara drastis dari 0 hingga sekitar 0.9 Å. Kenaikan drastis RMSD yang dialami kompleks berasal dari pemanasan yang terjadi saat 2 ps pertama simulasi. Tren grafik yang terus naik berarti kompleks terus bergerak dan menjauhi posisi awal.

Perbandingan gambar 5.35(a) dengan 5.36(a) menunjukkan bahwa kondisi kedua kompleks, 8H5-2ibx dan 8H5-CDC, berada dalam keadaan serupa dengan pergeseran yang terjadi namun masih ada interaksi antara HA dengan 8H5. Kedua

HA terlihat mengalami pergeseran paling besar pada bagian bawah HA dengan tidak ada interaksi yang langsung terjadi dengan 8H5. Grafik RMSD masing – masing kompleks pun memiliki tren yang sama yaitu terus naik.

Grafik RMSD pada umumnya digunakan untuk mengkonfirmasi kestabilan struktur saat simulasi. Kestabilan sistem sendiri biasanya diperlihatkan oleh grafik RMSD yang berfluktuasi selama simulasi seperti dalam penelitian Schulten et al. yang telah dibahas dalam bab Tinjauan Pustaka. Sayangnya hasil simulasi penelitian ini tidak bisa dibandingkan dengan penelitian – penelitian lain yang berhubungan dengan interaksi antibodi - antigen karena belum ditemukannya dokumentasi mengenai penelitian antibodi – antigen yang menggunakan

SDM



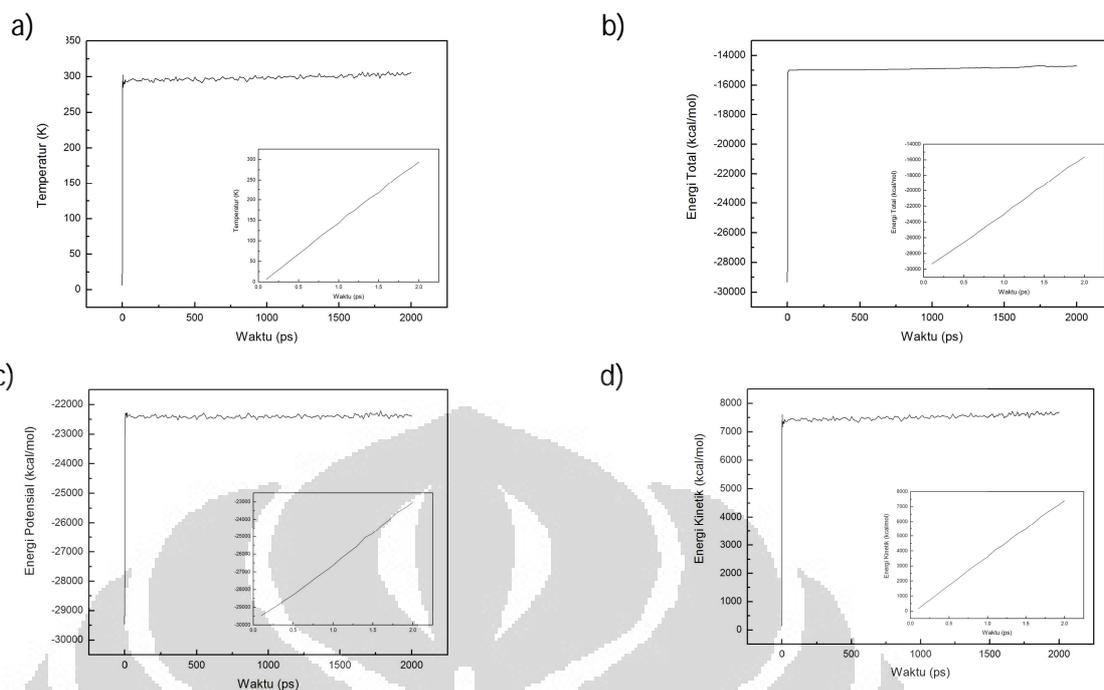
Gambar 5.37 (a) plot temperatur terhadap waktu,(b) plot energi total kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu, (c) plot energi potensial kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu, dan (d) plot energi kinetik kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu.

Salah satu upaya untuk mengetahui kestabilan suatu sistem selain dari informasi struktural seperti plot RMSD juga dapat melalui energi sistem selama simulasi berlangsung. Gambar 5.37 memperlihatkan beberapa grafik yang dihasilkan dari SDM. Gambar 5.37(a) memperlihatkan temperatur terhadap

waktu. Terlihat dari kurva adanya kenaikan yang cukup drastis pada awal kurva dari 0 K hingga sekitar 300 K. Ini merupakan pemanasan sistem yang terjadi saat 2 ps pertama simulasi. Setelah 2 ps berlalu maka temperatur sistem mengalami fluktuasi pada temperatur rata – rata 300 K selama simulasi.

Energi total kompleks 8H5-2ibx selama simulasi dapat dilihat pada gambar 5.37(b). Plot energi total terhadap waktu simulasi memperlihatkan garis yang naik secara teratur pada 2 ps pertama simulasi lalu membentuk garis lurus horizontal yang relatif lurus hingga akhir simulasi, dimana pada saat itu sistem dianggap berada dalam kondisi setimbang. Garis horizontal yang lurus tersebut menunjukkan bahwa energi sistem selama simulasi relatif stabil. Walaupun kompleks 8H5-2ibx mengalami agitasi termal, interaksi yang terjadi antara 8H5 dan 2ibx terjaga jika dilihat berdasarkan energi total kompleks. Seandainya agitasi termal menyebabkan adanya pemutusan ikatan antara molekul maka kurva energi total kompleks membentuk kurva yang naik dengan maksima yang tinggi setelah 2 ps. Maksima yang tinggi saat simulasi berjalan pada keadaan termal yang setimbang mengindikasikan bahwa ada ikatan yang terputus antara 8H5 dengan 2ibx sehingga atom – atom yang tadinya sukar bergerak karena membentuk suatu ikatan kini dapat bergerak bebas.

Hukum konservasi energi menyatakan bahwa energi suatu sistem dapat berubah bentuk tapi harus tetap terjaga. Perubahan bentuk energi potensial kompleks 8H5-2ibx menjadi energi kinetik dapat terlihat pada gambar 5.37 (c) dan (d). Gambar 5.37 (c) memperlihatkan kurva energi potensial terhadap waktu simulasi sementara gambar 5.37 (d) memperlihatkan kurva energi kinetik terhadap waktu simulasi. Dengan membandingkan kedua kurva energi tersebut didapatkan bahwa minima pada kurva energi potensial berkorelasi dengan maksima pada kurva energi potensial. Sebaliknya juga demikian, maksima pada kurva energi potensial berkorelasi dengan minima pada kurva energi kinetik. Hal tersebut mengindikasikan bahwa ada perubahan energi potensial menjadi energi kinetik sehingga energi terkonservasi dan jika kedua grafik energi dijumlah maka akan menghasilkan kurva energi total (gambar 5.37(b)).

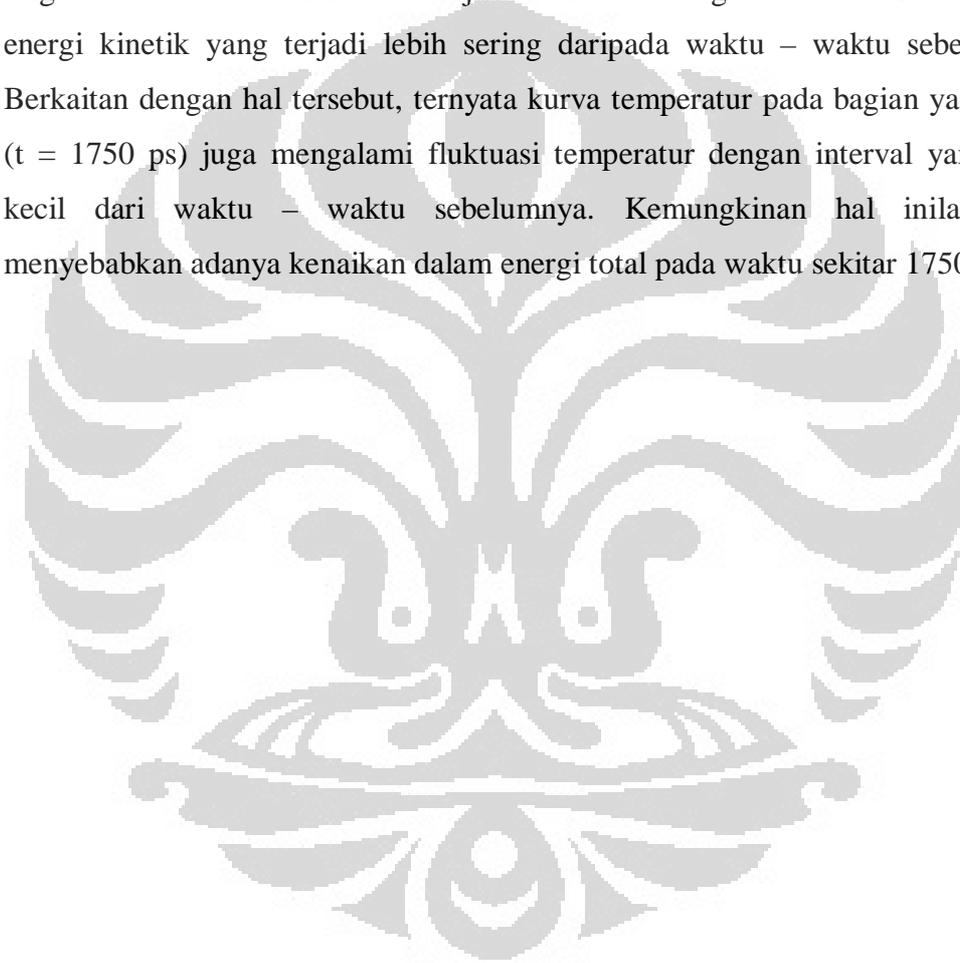


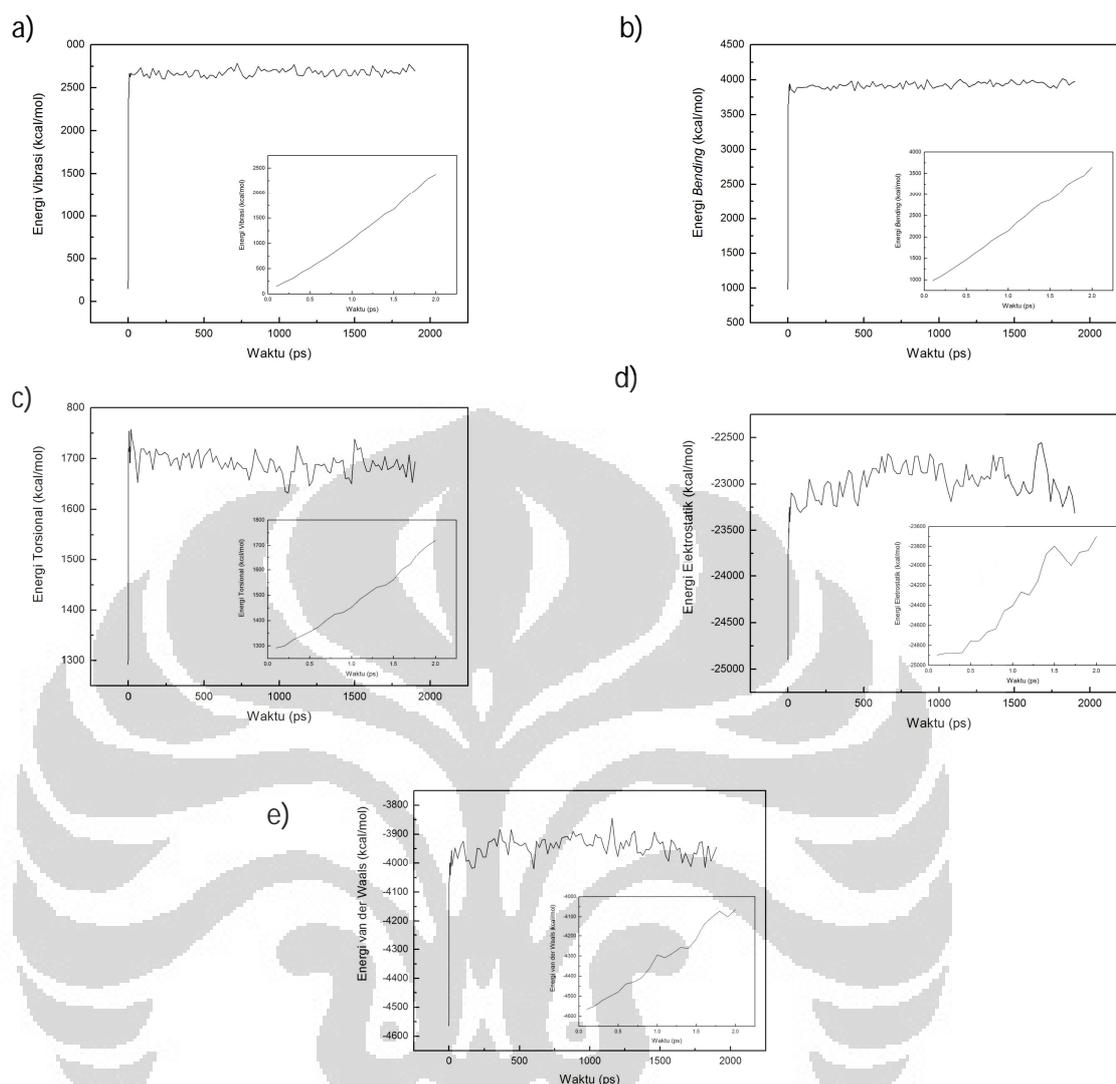
Gambar 5.38 (a) plot temperatur terhadap waktu, (b) plot energi total kompleks 8H5-CDC terhadap waktu, (c) plot energi potensial kompleks 8H5-CDC terhadap waktu, dan (d) plot energi kinetik kompleks 8H5-CDC terhadap waktu.

Kurva energi dan temperatur hasil simulasi 8H5-CDC dapat dilihat pada gambar 5.38. Gambar 5.38 (a) menunjukkan kurva temperatur terhadap waktu simulasi. Kenaikan tajam pada awal kurva terlihat yang mengindikasikan berlangsungnya pemanasan kompleks 8H5-CDC dari 0 K hingga sekitar 300K. Kenaikan temperatur yang tajam itu lalu diikuti dengan fluktuasi temperatur hingga akhir simulasi dengan temperatur rata – rata 300 K.

Grafik energi total kompleks 8H5-CDC yang diperlihatkan oleh gambar 5.38 (b) menunjukkan bahwa setelah pemanasan energi kompleks cukup stabil yang diindikasikan oleh garis horizontal yang relatif lurus. Yang menarik dari kurva ini adalah kenaikan energi yang terjadi pada waktu sekitar 1750 ps. Energi kompleks naik sedikit lalu kembali membentuk garis horizontal lurus pada waktu sekitar 1800 ps. Kenaikan energi total yang dialami kompleks tidak cukup untuk menihilkan interaksi antara 8H5 dan CDC karena pada akhir simulasi 8H5 masih dekat dan ‘menempel’ dengan CDC berdasarkan gambar 5.38(a).

Gambar 5.38(d) memperlihatkan kurva energi potensial 8H5-CDC dan jika dihubungkan dengan kurva energi kinetik maka terlihat ada perubahan energi potensial menjadi energi kinetik. Kurva energi kinetik kompleks 8H5-CDC (gambar 5.38(c)) membentuk kurva yang sama dengan kurva temperatur mengindikasikan bahwa agitasi termal menyebabkan adanya pergerakan molekul. Suatu hal yang menarik dari kurva energi kinetik adalah pada bagian akhir kurva yang mengindikasikan ada sedikit kenaikan energi dari waktu sekitar 1750 ps. Bagian akhir kurva tersebut menunjukkan bahwa energi mulai naik saat fluktuasi energi kinetik yang terjadi lebih sering daripada waktu – waktu sebelumnya. Berkaitan dengan hal tersebut, ternyata kurva temperatur pada bagian yang sama ($t = 1750$ ps) juga mengalami fluktuasi temperatur dengan interval yang lebih kecil dari waktu – waktu sebelumnya. Kemungkinan hal inilah yang menyebabkan adanya kenaikan dalam energi total pada waktu sekitar 1750 ps.





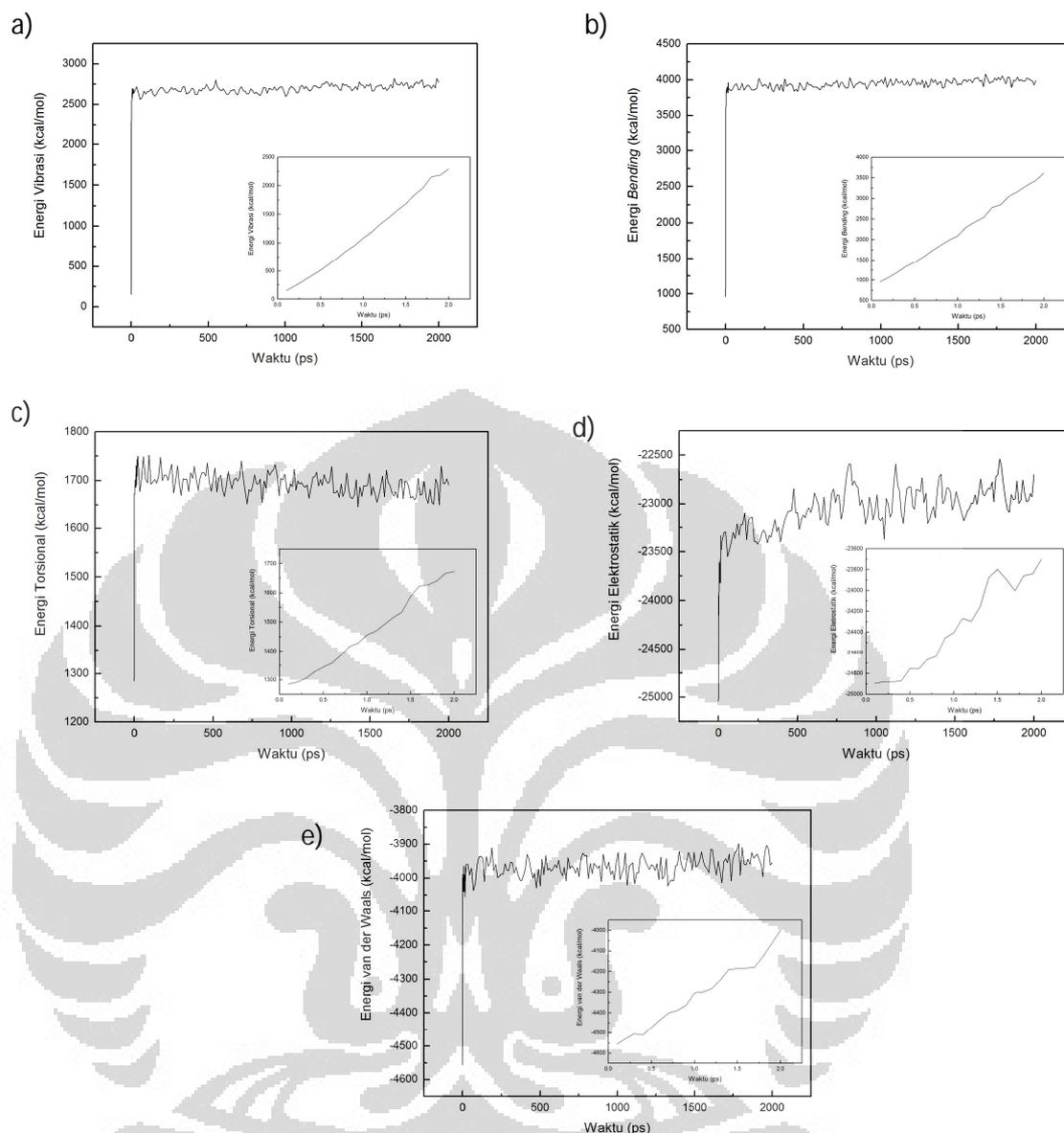
Gambar 5.39 komponen-komponen energi kompleks 8H5-2ibx terhadap waktu simulasi berdasarkan medan gaya CharmM. (a) energi vibrasi terhadap waktu. (b) energi bending terhadap waktu. (c) energi torsional. (d) energi elektrostatik terhadap waktu. (e) energi van der Waals terhadap waktu.

Analisis energi-energi seperti yang telah dilakukan di atas dapat menerangkan stabilitas sistem secara umum selama SDM. SDM yang dilakukan di penelitian ini merupakan SDM berbasis medan gaya CharmM dan untuk memberikan gambaran lebih detail mengenai keadaan sistem dari segi energetiknya maka di bawah akan diterangkan mengenai elemen – elemen energi yang dihitung dengan formulasi medan gaya CharmM.

Gambar 5.39 menunjukkan kurva – kurva energi kompleks 8H5-2ibx berdasarkan elemen-elemen energi medan gaya CharmM. Gambar 5.39 (a) dan (b)

menunjukkan kurva energi vibrasi dan *bending* molekul selama simulasi. Kurva masing – masing memperlihatkan fluktuasi yang terjadi dan terlihat cukup terjaga dengan energi rata – rata masing – masing 2670 kcal/mol untuk energi vibrasi dan 3853 kcal/mol untuk energi *bending*. Gambar 5.39 (c) menunjukkan grafik energi torsional untuk kompleks 8H5-2ibx. Fluktuasi energi torsional cukup besar sepanjang simulasi dengan rata – rata 1694 kcal/mol. Fluktuasi energi torsional yang besar mengindikasikan bahwa rantai – rantai pembentuk 8H5 dan 2ibx cukup lentur. Kelenturan itu yang menyebabkan kurva RMSD yang terus naik juga pembengkokan rantai bagian bawah 2ibx yang cukup berbeda dari posisi awalnya (gambar 5.39(a)).

Kurva – kurva yang diperlihatkan pada gambar 5.39 (d) dan (e) menunjukkan energi berdasarkan interaksi atom – atom *non-bonded*. Masing – masing kurva memperlihatkan adanya fluktuasi selama simulasi terjadi dan memperlihatkan bahwa rentang waktu antar *node* pada kurva sebesar 150 ps sehingga dapat dideduksi bahwa interaksi muatan yang terjadi cukup terjaga.



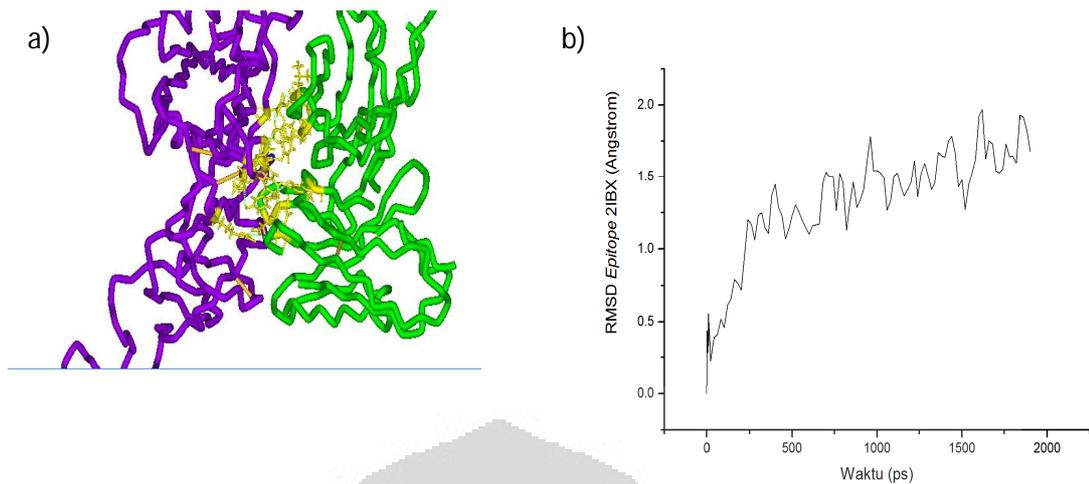
Gambar 5.40 komponen-komponen energi kompleks 8H5-CDC terhadap waktu simulasi berdasarkan medan gaya CharmM. (a) energi vibrasi terhadap waktu. (b) energi bending terhadap waktu. (c) energi torsional. (d) energi elektrostatik terhadap waktu. (e) energi van der Waals terhadap waktu.

Gambar di atas menunjukkan kurva – kurva energi kompleks 8H5-CDC berdasarkan medan gaya CharmM. Gambar 5.40 (a) dan (b) memperlihatkan kurva energi vibrasi dan *bending* dari molekul – molekul pembentuk 8H5 dan CDC. Terlihat dari kurva – kurva tersebut bahwa sistem cukup stabil setelah pemanasan dengan energi rata – rata 2633 kcal/mol untuk energi vibrasi dan 3807

kcal/mol untuk energi *bending*. Kurva energi torsional (gambar 5.40 (c)) memperlihatkan fluktuasi energi yang cukup tinggi.

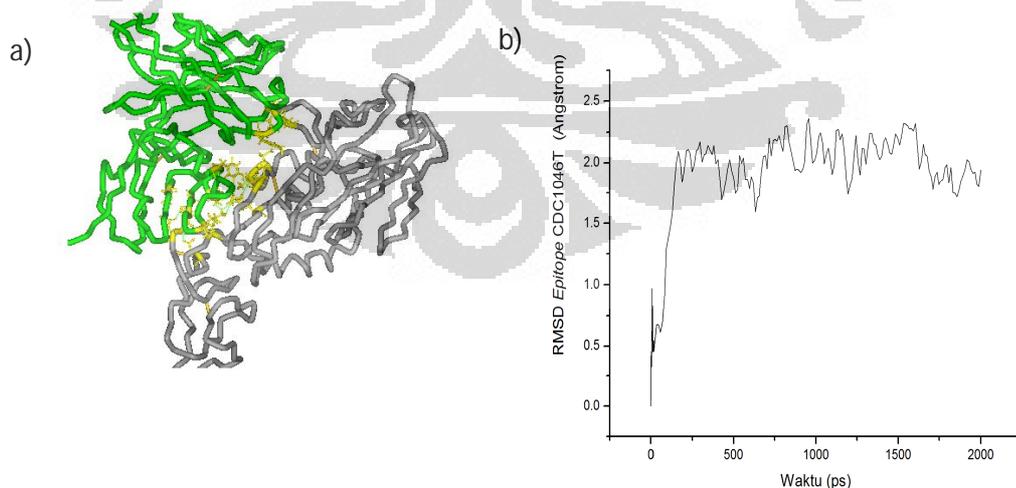
Energi – energi *non-bonded* memperlihatkan kurva dengan fluktuasi tinggi dengan frekuensi tinggi (gambar 5.40 (d) dan (e)). Pada gambar 5.40 (d) waktu yang dibutuhkan untuk suatu node mencapai node selanjutnya rata – rata sebesar 62 ps sementara pada gambar 5.40(e) rata – rata sebesar 50 ps. Bila kurva – kurva energi *non-bonded* 8H5-CDC dibandingkan dengan kurva – kurva *non-bonded* 8H5-2ibx maka interaksi antar muatan lebih sering dijumpai pada kompleks 8H5-CDC. Satu hal lagi yang menarik adalah bila dihubungkan dengan kurva energi total (gambar 5.40(b)). Pada akhir kurva energi total ada sedikit kenaikan energi. Bila sebelumnya telah disebutkan bahwa kenaikan energi tersebut tidak cukup untuk ‘membuyarkan’ kompleks tapi cukup untuk mengganggu ikatan – ikatan yang terjadi antar biomolekul maka dengan adanya frekuensi fluktuasi yang tinggi pada kurva – kurva energi *non-bonded* dideduksikan bahwa ikatan – ikatan yang terjadi antara 8H5 dan CDC kemungkinan besar tidak konstan. Lebih detailnya interaksi antar pasangan – pasangan atom tetap ada namun atom – atom yang membentuk pasangan – pasangan tersebut kerap berubah dan bergantian.

Analisis yang telah dilakukan sebelumnya merupakan analisis terhadap keadaan struktural dan energetik kompleks 8H5-HA secara global. Hasil simulasi yang akan dibahas selanjutnya akan menyangkut daerah yang lebih spesifik yaitu epitope netralisasi yang telah didefinisikan sebelumnya. Hal pertama yang akan dilihat adalah RMSD epitope netralisasi selama simulasi berlangsung.



Gambar 5.41(a) kompleks 8H5 (hijau)-2ibx(ungu) dengan epitope netralisasi 2ibx berwarna kuning. (b) kurva RMSD epitope netralisasi terhadap waktu simulasi.

Gambar 5.41(b) menunjukkan kurva RMSD epitope netralisasi 2ibx terhadap waktu simulasi. Terlihat dari kurva RMSD bahwa ada fluktuasi selama simulasi dan RMSD rata – rata epitope 2ibx adalah 1.5 Angstrom. Berdasarkan kurva tersebut maka epitope cenderung stabil selama simulasi. Hal ini dibenarkan karena fokus subyeknya merupakan satu bagian yang relatif kecil dari kompleks yang begitu besar sehingga pernyataan tersebut tidak mengkontradiksi dengan pernyataan mengenai RMSD struktur global kompleks 8H5-2ibx. Adanya fluktuasi RMSD dan RMSD rata – rata 1.5



Gambar 5.42(a) kompleks 8H5 (hijau)-2ibx(ungu) dengan epitope netralisasi 2ibx berwarna kuning. (b) kurva RMSD epitope netralisasi terhadap waktu simulasi.

Kurva RMSD epitope CDC terhadap waktu ditunjukkan pada gambar 5.42(b). Kurva memperlihatkan adanya fluktuasi selama simulasi dengan RMSD rata – rata sebesar 1.8 Angstrom. Perbandingan antara kurva RMSD epitope 2ibx dan CDC memperlihatkan bahwa interaksi lebih terjaga pada epitope 2ibx karena deviasi yang lebih rendah. Hal ini dapat menjelaskan mengapa kurva energi total kompleks 8H5-CDC memiliki kenaikan energi di akhir kurva sementara kurva energi total kompleks 8H5-2ibx cenderung lurus.

Metode analisis selanjutnya yang akan digunakan untuk analisis struktural epitope netralisasi merupakan analisis terhadap perubahan SAS. Δ SAS yang akan dihitung adalah perubahan antara SAS hasil SDM dengan SAS hasil molecular docking.

Tabel 5.5 Δ SAS asam amino pembentuk epitope netralisasi 2IBX dari proses molecular docking yang telah menjalani SDM.

No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)	No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)
1	ASP72	48.146	12	SER124	39.99
2	GLU73	95.451	13	SER125	10.702
3	ILE75	57.721	14	SER137	2.229
4	ASN76	105.021	15	ALA138	29.775
5	VAL77	21.245	16	TYR141	78.808
6	HIS114	-2.661	17	GLN142	108.121
7	GLU116	48.176	18	GLY143	18.074
8	LYS117	29.726	19	LYS144	21.931
9	ILE118	7.548	20	SER146	11.566
10	GLN119	59.142	21	ARG149	40.642
11	LYS123	-5.276	22	TYR256	69.655

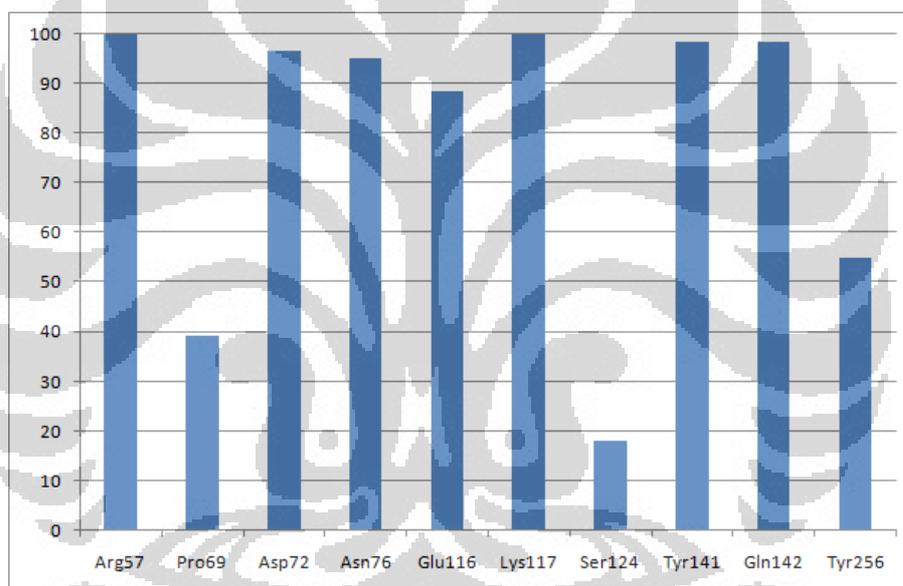
Tabel 5.6 Δ SAS asam amino pembentuk epitope netralisasi pada CDC dari hasil molecular docking setelah SDM.

No	Asam Amino	Δ SAS (\AA^2)			
1	ASP84	27.461	11	VAL147	10.487
2	ASN88	45.3	12	PRO152	21.533
3	VAL89	22.292	13	TYR153	49.906
4	PRO90	82.537	14	LEU154	27.474
5	GLU91	-15.272	15	GLY155	19.305
6	GLU97	12.284	16	SER156	-3.282
7	ASN112	18.576	17	SER158	15.273
8	ILE132	26.763	18	ARG161	26.025
9	ILE133	-0.567	19	GLU267	-0,472
10	SER136	16.094	20	TYR268	26.877

Tabel - tabel di atas merupakan data Δ SAS asam amino pada 2IBX dan CDC setelah simulasi. Berdasarkan tabel - tabel di atas ada beberapa asam amino yang memiliki nilai Δ SAS negatif. Nilai Δ SAS yang negatif menandakan permukaan asam amino yang tidak tertutup lagi oleh 8H5 sehingga memiliki kemungkinan untuk berikatan dengan sel yang berpotensi untuk terinfeksi. Dalam publikasi Yan et al. Lys123 pada 2ibx didefinisikan sebagai epitope netralisasi. Δ SAS Lys123 menurut publikasinya sebesar 28.056 \AA^2 sementara pada penelitian ini didapatkan Δ SAS -5.276 \AA^2 setelah simulasi dilakukan. Perbedaan mendasar antara kedua data tersebut adalah dalam publikasi Yan et al. definisi epitope netralisasi hanya bergantung pada molecular docking maka tidak ada informasi yang didapatkan oleh mereka bahwa SDM dilakukan terhadap kompleks 8H5 - 2IBX permukaan Lys123 akan terbuka. Walaupun ada nilai Δ SAS negatif pada asam amino 2IBX

dan CDC, dispekulasikan asam amino tersebut masih dalam kategori epitope netralisasi karena asam amino sekelilingnya masih tertutup oleh 8H5.

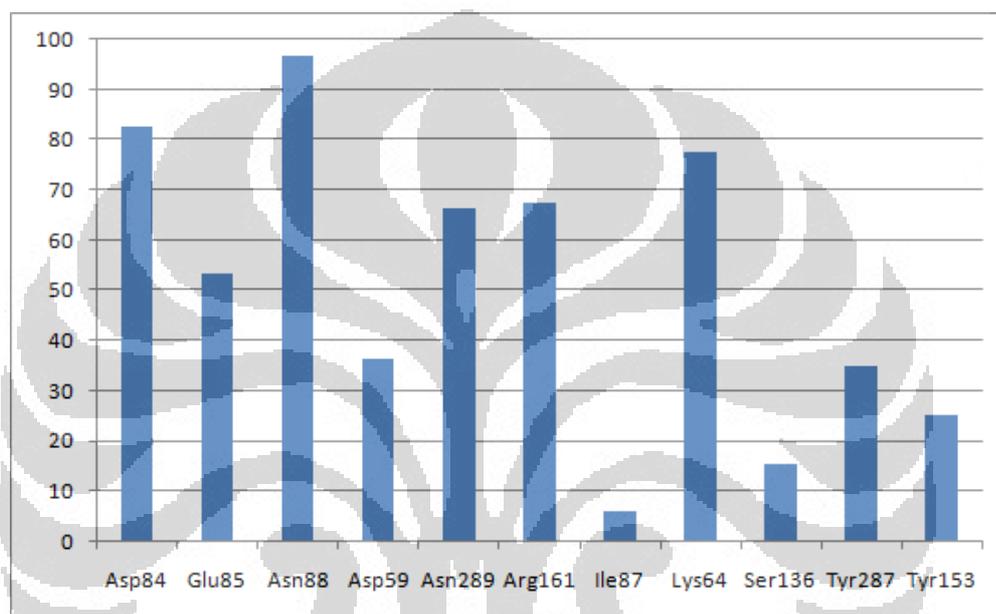
Definisi epitope netralisasi tidak hanya berdasarkan perubahan SAS molekul HA, namun juga ikatan hidrogen yang terbentuk antara 8H5 dengan HA. Ikatan hidrogen yang terjadi pada masing – masing kompleks telah disebutkan sebelumnya pada bagian molecular docking, namun suatu hal yang perlu disadari adalah ikatan – ikatan yang terbentuk saat docking kemungkinan tidak akan terjaga selama SDM. Karena pengamatan ikatan hidrogen secara individu selama simulasi sukar dilakukan maka yang diamati adalah okupansi ikatan hidrogen yang terbentuk pada daerah interaksi 8H5-HA selama simulasi berlangsung.



Gambar 5.43 Okupansi ikatan hidrogen pada daerah interaksi 8H5-2ibx selama simulasi.

Pada gambar 5.43 terlihat ada 10 asam amino yang berkontribusi pada pemebentukan ikatan hidrogen dengan 8H5. Dari kesepuluh itu ada 2 di antaranya yang tetap membentuk ikatan hidrogen 100% selama simulasi berlangsung yaitu Arginin 57 dan Lysin 117. Adapula lima asam amino lainnya dengan okupansi ikatan hidrogen antara asam amino epitope tersebut dengan 8H5 melebihi 80%. Asam amino tersebut adalah Aspartat 72, Asparagin 76, Glutamin 116, Tyrosin 141, dan Glysine 142. Selebihnya ada tiga asam amino dengan okupansi ikatan hidrogennya kurang dari 60%, yaitu Prolin 69, Serin 124, dan Tyrosin 256. Enam

dari sepuluh asam amino di atas merupakan asam amino pembentuk epitope. Satu hal yang menarik untuk diamati adalah okupansi ikatan hidrogen pada Glysin 142 yang sebelumnya tidak membentuk ikatan hidrogen dengan salah satu asam amino 8H5 setelah molecular docking tapi ternyata membentuk ikatan hidrogen saat simulasi berlangsung dengan okupansi sebesar 98%. Hal ini mengindikasikan bahwa kedinamisan sistem menyebabkan terbentuknya ikatan hidrogen antara 8H5 dan 2ibx

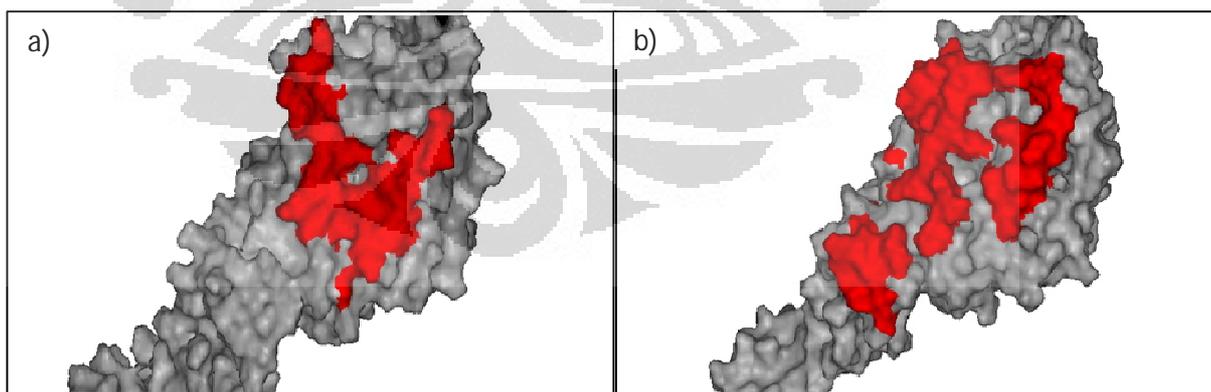


Gambar 5.44 Okupansi ikatan hidrogen pada daerah interaksi 8H5-CDC selama simulasi.

Selanjutnya okupansi ikatan hidrogen antara asam amino CDC dengan 8H5 dapat dilihat pada gambar 5.44. CDC memiliki 11 asam amino yang membentuk ikatan hidrogen dengan 8H5. Dari 11 asam amino tersebut tidak ada asam amino dengan okupansi 100% dan hanya dua di antaranya memiliki okupansi ikatan hidrogen lebih dari 80%, yaitu Aspartat 84 dan Asparagin 88. Asam amino dengan okupansi 50% - 80% berjumlah empat, yaitu Glutamin 85, Asparagin 289, Arginin 161, dan Lysin 65. Sehingga epitope CDC yang tadinya membentuk tiga ikatan hidrogen lewat Asparagin 88, Aspartat 84, dan Tyrosin 153 kini terbentuk oleh 11 asam amino walaupun okupansi ikatan hidrogen untuk semuanya tidak ada yang 100%. Ada hal yang menarik dari gambar okupansi hidrogen CDC jika dikaitkan dengan kurva energi *non-bonded* (gambar 5.40(d))

dan (e)). Frekuensi fluktuasi energi *non-bonded* yang tinggi dapat dikaitkan dengan kedinamisan atom – atom penyusun biomolekul yang tinggi sehingga interaksi muatannya juga sering berubah. Interaksi muatan yang kerap berubah dapat dilihat dari gambar okupansi ikatan hidrogen yang memperlihatkan tidak ada asam amino yang memiliki okupansi 100%.

Berdasarkan semua hal yang telah disebutkan satu hal terakhir yang dapat diamati adalah pola penghalangan 8H5 terhadap masing – masing HA selama simulasi berlangsung. Berdasarkan perubahan SAS dan okupansi ikatan hidrogen pada HA selama SDM maka pola penghalangan yang kemungkinan besar adalah pola netralisasi 8H5 terhadap masing – masing HA dapat dilihat pada gambar 5.45. Terlihat pada gambar tersebut bahwa daerah CDC yang dihalangi lebih luas dibandingkan dengan 2ibx. Walaupun demikian jika kita mengamati kontras warna yang menandakan tingkat terhalangnya suatu asam amino didapatkan bahwa 8H5 menghalangi 2ibx lebih kuat dibandingkan CDC dan memperhitungkan. Satu hal yang dapat digagaskan dari gambar 5.45 ini adalah bila antibodi 8H5 diintroduksi maka epitope netralisasi 2ibx lebih efektif berperan dalam netralisasi HA Virus Avian Influenza asal Vietnam dibandingkan dengan Virus Avian Influenza asal Indonesia.



Gambar 5.45(a) Daerah 2ibx yang dihalangi oleh 8H5 sepanjang simulasi diindikasikan oleh warna merah. (b) Daerah CDC yang dihalangi oleh 8H5 sepanjang simulasi diindikasikan oleh warna merah.

BAB VI

SIMPULAN

Studi mengenai aktivitas yang terjadi di epitope netralisasi diteliti dengan menggunakan struktur molekul HA virus H5N1 asal Vietnam (2IBX) dan HA virus H5N1 asal Indonesia (CDC) dengan masing – masing struktur diinteraksikan dengan struktur fragmen variabel antibodi 8H5. Struktur 2IBX diperoleh dengan menggunakan struktur 3D yang sudah tersimpan dalam bank data protein sementara CDC digenerasikan berdasarkan struktur 2IBX yang lalu dimodifikasi dengan memutasikan 18 residu asam amino. CDC memiliki kesamaan struktural dengan 2IBX sebesar 94.7%. Selain itu antibodi 8H5 digenerasikan dari sekuens asam amino fragmen variabel antibodi dan berdasarkan analisis energi, penilaian Profile-3D, serta analisis SAS didapatkan model 8H5 cukup baik.

Epitope netralisasi diamati dengan menginteraksikan 8H5 dengan HA menggunakan *molecular docking*. Epitope netralisasi ditentukan berdasarkan hasil *molecular docking* dengan mempertimbangkan Δ SAS asam amino sebelum dan sesudah docking dan ikatan hidrogen yang terbentuk di daerah interaksi kompleks 8H5 – HA. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa epitope netralisasi 2IBX dan CDC berada di tempat yang serupa. Walaupun demikian, asam amino pembentuk epitope netralisasi 2IBX, dengan 22 asam amino, lebih banyak daripada epitope netralisasi CDC, dengan 20 asam amino.

Interaksi yang dihasilkan *Molecular docking* merupakan interaksi dalam kondisi yang ideal, yaitu dengan tidak mempertimbangkan fluktuasi temperatur, tidak adanya pelarut, dan dalam keadaan diam sehingga untuk mengamati epitope netralisasi lebih lanjut simulasi dinamika molekuler digunakan. Simulasi diupayakan mendekati keadaan nyata laboratorium sehingga kompleks dipanaskan dari 0 K hingga 300 K dan terlarut secara implisit menggunakan metode Generalised Born with Molecular Volume (GBMV). Hasil yang didapatkan dari simulasi dinamika molekuler kompleks 8H5 – 2IBX dan 8H5 – CDC menegaskan bahwa energi sistem kedua kompleks cenderung stabil. Tidak hanya itu kurva RMSD epitope netralisasi 8H5-2IBX dengan rata – rata 1.5 Å

menunjukkan kestabilan yang lebih terjaga dibandingkan dengan epitope netralisasi 8H5–CDC dengan rata – rata 1.8 Å. Selebihnya Δ SAS yang terjaga dan okupansi ikatan hidrogen juga menegaskan bahwa seiring berjalannya waktu 8H5 akan menghalangi residu 2IBX lebih efektif dibandingkan dengan CDC. Dengan demikian antibodi 8H5 diperkirakan dapat menetralsir HA virus H5N1 asal Vietnam (2IBX) lebih efektif daripada HA virus H5N1 asal Indonesia (CDC).

Suatu hal yang perlu disadari adalah penelitian mengenai pengamatan terhadap epitope netralisasi dapat dikembangkan lebih lanjut sehingga bisa mendapatkan “blue print” untuk memproduksi suatu vaksin yang ampuh terhadap virus H5N1. Namun sebelum “blue print” tersebut dapat diperoleh ada beberapa hal yang perlu diperhatikan untuk menindak lanjuti penelitian ini. Sebagai tindak lanjut dari penelitian yang masih sangat awal ini, ada beberapa hal penting yang sangat dianjurkan untuk dilakukan:

1. Mengamati aktivitas epitope netralisasi HA virus H5N1 asal Indonesia dalam skala yang lebih luas dengan mengintroduksi antibodi 8H5.
2. Menggunakan antibodi lain selain 8H5 untuk mengamati epitope netralisasi HA virus H5N1 asal vietnam (2ibx) dan Indonesia (CDC).
3. Setting parameter lingkungan sistem yang akan disimulasikan agar lebih mendekati kenyataan seperti solvasi dengan menggunakan molekul – molekul air secara eksplisit, variasi tekanan dan temperatur, serta penentuan tingkat garam dalam larutan.
4. Penentuan struktur virus H5N1 asal Indonesia dengan XRD atau NMR, dimana untuk melakukan hal ini diperlukan kerjasama dengan disiplin ilmu terkait yakni mikrobiologi. Hal ini penting sebab *starting model* simulasi berdasarkan struktur yang digenerasikan oleh XRD ataupun NMR.

Dengan menyadari hal – hal di atas, diharapkan penelitian ini merupakan awal dari sebuah fokus penelitian yang nantinya dapat dikembangkan menjadi sesuatu yang disebut sebagai “desain vaksin berbasis komputer” sebagai salah satu upaya dalam memerangi pandemi penyebaran virus H5N1 di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. (2005). *Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans*. The New England Journal of Medicine Volume 353:1374-138
2. World Health Organization. (2009). *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO*. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_tabl_2009_02_09/en/index.html
3. de Jong M.D. & Tran Tinh Hien.(2006). *Avian Influenza A (H5N1)*. Oxford University Clinical Research Unit, Hospital for Tropical Diseases, 190 Ben Ham Tu, District 5, Ho Chi Minh City, Viet Nam
4. Kamps B.S., Hoffman C. & Preiser W. (2006). *Influenza Report 2006*. Flying Publisher. <http://www.influenzareport.com>
5. <http://virology-online.com/general/Test8.htm>
6. Jensen F. (2007). *Introduction to Computational Chemistry* (2nd ed.). England: John Wiley & Sons Ltd
7. Carter J., Saunders V. *Virology Principles and Application*. England: John Wiley & Sons Ltd
8. Stevens J., Blixt O., Tumpey T., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. *Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus*. *Science* Vol. 312. no. 5772, pp. 404 – 410
9. Lim,A., Steven Wong, Annie Chan, Conrad Chan, Eng Ooi, dan Brendon Hanson. *Epitope characterization of the protective monoclonal antibody VN04-2 shows broadly neutralizing against highly pathogenic H5N1*. *Virology Journal* 2008, 5:80.
10. Yoshinobu O., Yuji Isegawa, Fuyoko Sasao, dan Shigeharu Ueda. *A Common Neutralizing Epitope Conserved between the Haemagglutinins*

- Influenza Virus A H1 and H2 Strains*. Journal of Virology, May 1999, p.2552-2558.
11. Yan YuanQing, Li ShaoWei, Yang ChunYan, Luo WenXin, Wang MingQiao, Chen YiXin, Luo HaiFeng, Wu Ting, Zhang Jun & Xia NingShao. 2008. *Prediction of a Common Neutralizing Epitope of H5N1 Avian Influenza Virus by in silico Molecular Docking*. Chinese Science Bulletin Volume 53:868-877
 12. Schulten K., Ly Le, Eric Lee, dan Tanh Truong. “Molecular modeling of swine influenza A/H1N1, Spanish H1N1, and avian H5N1 flu N1 neuraminidases bound to Tamiflu and Relenza.” <
<http://knol.google.com/k/ly-le/molecular-modeling-of-swine-influenza-a/30e8n4orj1dsd/1#>>
 13. Udommaneethanakit T., Thanyada Rungrotmongko, Urban Bren, Vladimir Frecer, dan Miertus Stanislav. “Dynamic Behaviour of Avian Influenza A Virus Neuraminidase Subtype H5N1 in Complex with Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, and ther Phosphonate Analogues.” J. Che Inf. Model., 2009, 49 (10), p. 2323-2332.
 14. Li Y., Bingcheng Zhou, dan Renxiao Wang. “Rational design of Tamiflu derivatives targeting at the open conformation of neuraminidase subtype 1.” Journal of Molecular Graphics and Modelling, Vol. 28, No. 3. (11 October 2009), p. 203-219.
 15. Leach A., *Molecular Modeling: principles and application*. Prentice Hall. 2001
 16. Morea V., Lesk A.M., Tramontano A. *Antibody Modeling: Implications for Engineering and Design*. METHODS 20 (2009). pp. 267 – 279
 17. Chen R., Weng Z. *A Novel Shape Complimentarity Scoring Function for Protein – Proten Docking*. Poteins, 2003, 5: 397-408
 18. Connolly M.L., *Molecular Surfaces: Solvent Accessible Surfaces*. <http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature14e.html>

19. Rose G.D. 1993. *Hydrogen Bonding, Hydrophobicity, Packing, and Protein Folding*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22:381-415
20. Sholl D.S., Steckel J.A. *Density Functional Theory: A Practical Introduction*. 2009. England. John Wiley & Sons
21. Gill P.M.W., Johnson B.G., Pople J.A., 1992. *The performance of the Becke-Lee-Yang-Parr (B-LYP) Density Functional Theory with Various Basis Sets*. Chemical Physics Letters Volume 197, number 4,5
22. Romera E., Dehesa J.S. *Weizsacker energy of many-electron systems*. Physical Review A Volume 50 number 1, July 1994
23. Mulholland A.J. 2008. *Introduction. Biomolecular Simulation*. J. R. Soc. Interface 5, S169-S172
24. Xiang Y., Zhang D.W., Zhang J.Z.H. 2004. *Fully Quantum Mechanical Energy Optimization for Protein-Ligand Structure*. J Comput Chem 25: 1431-1437
25. Lee. M.S., Feig M., Salsbury F.R., Brooks C.L. 2003. *New Analytic Approximation to the Standar Molecular Volume Definition and Its Application to Generalized Born Calculations..* J Comput Chem 24: 1348-1356
26. Chothia C. et al. *Domain Association in Immunoglobulin Molecules. The Packing of Variable Domains*. J Mol Biol, 1985, 186, pp. 651-663
27. Philpot M., Easterday B.C., Hinshaw V.S. *Neutralizing Epitopes of the H5 Hemagglutinin from a Virulent Avian Influenza Virus and Their Relationship to Pathogenicity*. J Virol. August 1989. pp. 3453 – 3458
28. Yen HL, Peiris J. S. M. *Mapping Antibody Epitopes of the Avian H5N1 Influenza Virus*. PloS Medicine. April 2009 Volume 6
29. Swayne D.E., 2008. *Avian Influenza*. Blackwell Publishing. Iowa, USA

30. Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Ueda S. 1993. *A Common Neutralizing Epitope Conserved between the Hemagglutinins of Influenza A Virus H1 and H2 Strains*. Journal of Virology, May 1993, pp.2552-2558
31. Philpot M., Easterday B.C., Hinshaw V.S. 1989. *Neutralizing Epitopes of the H5 Hemagglutinin from a Virulent Avian Influenza Virus and Their Relationship to Pathogenicity*. J Virol. August 1989. pp. 3453 – 3458
32. Chen R., Weng Z. 2003. *A Novel Shape Complimentarity Scoring Function for Protein – Protein Docking*. Poteins, 5: 397-408
33. Morea V., Lesk A.M., Tramontano A. 2009. *Antibody Modeling: Implications for Engineering and Design*. METHODS 20. pp. 267 – 279
34. Brandas E., Kryacho E. 2004. *Advances in Quantum Chemistry: A Tribute Volume in Honour of Professor Osvaldo Goscinski*. Academic Press.
35. Rappe A.K., Casewit C.J. 1997. *Molecular Mechanics Across Chemistry*. University Science Books.
36. Feig M., Onufriev A., Lee. M.S., Im W., Case D.A., Brooks C.L. 2004. *Performance Comparison of Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures*. J Comput Chem 25: 265-284