



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL NEURAMINIDASE VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 DENGAN INHIBITOR  
POTENSIAL PEPTIDA SIKLIS DISULFIDA ( DNY, LRL, NNY)**

**SKRIPSI**

**RISKI IMANIASTUTI**

**0706263391**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI KIMIA**

**DEPOK**

**JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL NEURAMINIDASE VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 DENGAN INHIBITOR POTENSIAL  
PEPTIDA SIKLIS DISULFIDA ( DNY, LRL, NNY)

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

RISKI IMANIASTUTI

0706263391

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK


JULI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Riski Imaniastuti

NPM : 0706263391


Tanda Tangan : 

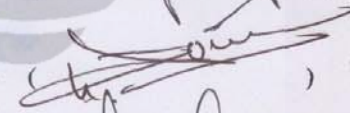
Tanggal : 7 Juli 2011

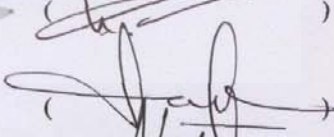
HALAMAN PENGESAHAN


Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Riski Imaniastuti  
NPM : 0706263391  
Program Studi : Kimia  
Judul Skripsi : Simulasi Dinamika Molekul Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida ( DNY, LRL, NNY)

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

Pembimbing : Prof. Dr. Usman Sumo F. Tambunan (  )

Penguji I : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc (  )

Penguji II : Dr. Endang Saepudin (  )

Penguji III : Dr. Arry Yanuar, M.Si (  )

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji hanya milik Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga Tugas Akhir dengan judul “**Simulasi Dinamika Molekul Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida (DNY, NNY, LRL)**” dapat terselesaikan. Tugas Akhir ini disusun guna melengkapi sebagian syarat untuk mencapai gelar Sarjana Strata Satu (S1) pada jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Keberhasilan penulis menyelesaikan Tugas Akhir ini adalah berkat bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Meskipun banyak hambatan dan rintangan yang dihadapi, namun dapat menjadi pelajaran dan pengalaman yang berarti kelak.

Pada kesempatan ini, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini, semoga Allah membalas kebaikan dengan yang lebih baik. Terima kasih terutama kepada :

1. Prof Usman Sumo Friend Tambunan selaku pembimbing penelitian yang telah banyak membimbing, membentuk kepribadian yang matang ditinjau dari hardskill maupun softskill serta menanamkan rasa kekeluargaan yang tinggi selama berada di ruangan beliau.
2. Dra. Susilowati Hadisusilo M.sc selaku pembimbing akademis yang telah banyak memberikan arahan dan petunjuk dalam menyelesaikan kuliah.
3. Drs. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI
4. Ayah-Ibu tersayang (Ayah-ibu juara satu seluruh dunia) atas segala doa dan dukungan yang tiada henti. Mas iwan atas pengingatannya kepada penulis untuk segera menyelesaikan tugas akhir ini
5. Bapak dan Ibu dosen Departemen Kimia atas ilmu yang telah diberikan
6. Tyas, Johannes, Kak Tirta atas waktu yang telah dilewatkan bersama di laboratorium kering kita. Berbagi semangat, keluhan, diskusi, keceriaan dan virus computer bersama

7. Kak Wiliam atas bantuannya menulis manuskrip, Pak Idrus, Kak Randy, Kak Hary, Kak Noval, Kak Rizky, Kak Agus atas ilmu bermanfaat dan diskusi yang telah diberikan
8. Alfin Syafalni (Universiti Sains Malaysia) atas bantuannya sehingga penulis bisa memperoleh jurnal-jurnal penunjang
9. Saudara/I seperjuangan di LDS 14- si Keren, Bintang Kecil, Fathanmubina, SJK, HMD Kimia 08/09, MII, Bem MIPA atas segala doa dan dukungannya
10. Saudara/I penelitian lainnya, Lab basah nih, Sherly, AW, Ikan, Zetry, Prita, Ina, Evi, Kak Nany, Kak Nope, Rafi, Rifan, Prita, Eno, Yulinar, Mega, Mak cik, Kak Desy, atas semangat yang kita bagi bersama. Semoga penelitian kita bisa bermanfaat untuk banyak orang
11. Saudara/I kimia 2007, Sabil, Rani, Widya, Fitriana, Ardilla, Atur, Tyo, Wahyu, Widi, Yomi, Yuliga, Savit, Ikor dll atas waktu kuliah yang dilewatkan bersama dengan segala keceriaan dan cerita. Saudara/I kimia 2008, 2009, 2010 yang terlalu banyak untuk disebutkan satu persatu
12. Dan beberapa yang tak bisa saya sebutkan satu persatu atas keikutsertaan dalam pengembangan dan kematangan diri penulis baik semasa kuliah maupun penyusunan skripsi ini.

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

Akhir kata besar harapan semoga penulisan ini bermanfaat bagi banyak orang.

Jakarta, Juni 2011

Penulis

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

---

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

Nama : Riski Imaniastuti  
NPM : 0706263391  
Program Studi : Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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

Simulasi Dinamika Molekul Neuraminidase Virus Influenza A sub tipe H1N1 dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida (DNY, LRL, NNY)

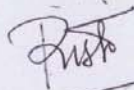
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 7 Juli 2011

Yang menyatakan



(Riski Imaniastuti)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Virus Influenza.....	5
2.2 Hemaglutinin (HA) .....	6
2.3 Neuraminidase (NA).....	7
2.4 Protein Matriks (M) .....	8
2.5 Polymerase A protein (PA), Polymerase B1 protein (PB1) dan Polymerase B2 Protein (PB2) .....	9
2.6 Protein NS1 dan NS2 .....	9
2.7 Mekanisme Replikasi Virus Influenza.....	9



2.8 Mutasi Virus Influenza .....	10
2.9 Neuraminidase Inhibitor .....	11
2.10 Drug Design and Drug Development.....	12
2.11 Peptida Drug Design .....	13
2.12 Bioinformatika .....	14
2.13 Database .....	14
2.14 GenBank Flatfile Format (GBFF).....	15
2.15 Format FASTA .....	15
2.16 Format PDB .....	16
2.17 Format PDBQT .....	16
2.18 Sequence Alignment .....	16
2.19 Molecular Modeling.....	17
2.20 Molecular Docking .....	17
2.21 Molecular Dynamics .....	18
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
3.1 Alat dan Bahan.....	20
3.2. Lingkup Kerja .....	20
3.2.1 Pencarian Sekuen data Neuraminidase .....	20
3.2.2 HomologyModelling Neuraminidase.....	21
3.2.3 Visualisasi Sisi Katalitik Neuraminidase .....	21
3.2.4 Perancangan Struktur 3 Dimensi Peptida Siklis Sebagai Ligan.....	21
3.2.5 Preparasi File Docking.....	21
3.2.5.1 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur 3D Neuraminidase.....	21
3.2.5.1 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur 3D Ligan .....	22
3.2.6 Molecular Docking .....	22

3.2.7 AnalisisMolecular Docking .....	23
3.2.7.1 Nilai Energi Bebas Ikatan.....	23
3.2.7.1 Ikatan Hidrogen .....	23
3.2.7.3 Kontak Residu .....	23
3.2.8 Preparasi File Simulasi Dinamika Molekul .....	23
3.2.9 Simulasi Dinamika Molekul .....	24
3.2.9.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 300 K.....	24
3.2.9.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Tempertaur 312 K.....	24
3.2.10 Analisis Simulasi Dinamika Molekul .....	25
3.2.10.1 Interaksi Enzim-Ligan.....	25
3.2.10.2 Konformasi Enzim-Ligan.....	25
3.2.10.3 RMSD.....	25
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
4.1. Pencarian Sekuen Neuraminidase H1N1 .....	26
4.2. Homology Modeling <i>Neuraminidase</i> .....	26
4.3 Visualisasi Sisi Katalitik <i>Neuraminidase</i> .....	27
4.4 Perancangan Struktur Tiga Dimensi Ligan Peptida.....	28
4.5 Preparasi File Molecular Docking .....	29
4.5.1 Optimasi Geometri dan Minimisai Neuraminidase.....	29
4.5.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Struktur 3 Dimensi Neuramunudase.....	30
4.6 Molecular Docking.....	30
4.7 Analisis Molecular <i>Docking</i> .....	32
4.7.1 Energi Bebas Ikatan.....	32
4.7.2 Ikatan Hidrogen .....	33
4.8 Simulasi Dinamika Molekul .....	36
4.8.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 300 K.....	39
4.8.2 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 312 K .....	39

4.9 Analisis Simulasi Dinamika Molekul .....	39
4.9.1 Analisis Interaksi Enzim-Ligan .....	40
4.9.1.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 300 K .....	40
4.9.1.2 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 312 K .....	45
4.9.2 Konformasi .....	52
4.9.3 RMSD .....	58
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>61</b>
5.1 Kesimpulan .....	61
5.2 Saran .....	61
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>63</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Virus Influenza.....	6
Gambar 2.2. Mekanisme Inhibitor Neuraminidase .....	8
Gambar 2.3. Mekanisme Replikasi Virus Influenza .....	10
Gambar 2.4. Struktur Oseltamivir.....	12
Gambar 4.1. Visualisasi Sisi Katalitik Neuraminidase .....	27
Gambar 4.2. Interaksi Ligan Hasil Docking .....	35
Gambar 4.3 Visualisasi Ikatan Hidrogen ligan NNY setelah Simulasi pada Temperratur 300 K.....	45
Gambar 4.4. Visualisai Ikatan Hidrogen ligan NNY setelah Simulasi pada Temperatur 312 K.....	51
Gambar 4.5. Konformasi Kompleks ligan DNY- Enzim.....	53
Gambar 4.6. Konformasi Kompleks ligan LRL- Enzim .....	54
Gambar 4.7. Konformasi Kompleks ligan NNY- Enzim.....	55
Gambar 4.8. Konformasi Kompleks ligan Zanamivir- Enzim.....	56
Gambar 4.9. Konformasi Kompleks ligan Oseltamivir- Enzim.....	57
Gambar 4.10.Perubahan Nilai RMSD ligan standar .....	58
Gambar 4.11.Perubahan Nilai RMSD ligan peptida.....	59

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kelebihan dan Kekurangan Peptida sebagai drug.....	14
Tabel 4.1. Data $\Delta G_{binding}$ hasil simulasi <i>docking</i> .....	33
Tabel 4.2 Residu Asam Amino Neuraminidase yang membentuk ikatan hidrogen dengan ligan .....	34
Tabel 4.3. Kontak Residu ligan selama simulasi pada Temperatur 300 K .....	40
Tabel 4.4 Perbandingan kontak residu yang terbentuk saat docking dan setelah simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K.....	44
Tabel 4.5. Kontak Residu ligan selama simulasi dinamika molekul 312 K .....	46
Tabel 4.6 Perbandingan interaksi setelah simulasi dinamika molekul kedua temperatur .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan kerja penelitian .....	67
Lampiran 2. Struktur dan kode asam amino .....	68
Lampiran 3. Struktur neuraminidase hasil optimasi .....	69
Lampiran 4. Struktur tiga dimensi ligan .....	70
Lampiran 5. Visualisasi dua dimensi ligan hasil simulasi .....	71
Lampiran 6. Gambar konformasi enzim pada simulasi dinamika molekul .....	77
Lampiran 7. Plot korelasi energi sistem total terhadap waktu pada tahap inisialisasi .....	92
Lampiran 8. Plot korelasi energi sistem total terhadap waktu pada tahap simulasi utama .....	97

## ABSTRAK

Nama : Riski Imaniastuti

Program Studi : Kimia

Judul : Simulasi Dinamika Molekul Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida (DNY, LRL, NNY)

Resistensi oseltamivir sebagai inhibitor neuraminidase virus influenza A subtype H1N1 telah dilaporkan oleh Cheng, et al pada tahun 2009. Sebagai salah satu upaya mengatasi permasalahan ini, beberapa penelitian yang menggunakan metode simulasi *molecular docking* telah dilakukan untuk merancang dan menemukan ligan peptida siklis yang dapat berperan sebagai inhibitor potensial neuraminidase H1N1 sehingga dapat menghambat replikasi virus tersebut. Pada penelitian ini dipelajari dan dievaluasi interaksi ligan terhadap enzim dalam keadaan terhidrasi dengan menggunakan metode simulasi dinamika molekul pada temperatur yang berbeda. Simulasi dilakukan terhadap tiga inhibitor peptida siklis disulfida yaitu DNY, LRL, NNY dan oseltamivir, zanamivir sebagai ligan standar. Hasil penelitian menunjukkan pergerakan dinamis yang dimiliki oleh kelima kompleks enzim-ligan dalam keadaan terhidrasi mempengaruhi interaksi ligan terhadap residu asam amino enzim. Pada akhir simulasi temperatur 300 K, ligan DNY memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Arg 293, ligan LRL dengan Arg 118, Arg 293, ligan NNY dengan Asp 151, Glu 425 dan Arg 293. Pada temperatur 312 K, ligan DNY tidak memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim. Ligan LRL memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Glu 425, Tyr 402, ligan NNY dengan Asp 151, Glu 278 dan Arg 293. Konformasi yang terlihat berbeda pada enzim memperlihatkan perilaku dinamis enzim dalam pelarut dan adanya pengaruh kehadiran inhibitor. Konformasi yang berubah akibat perilaku dinamis kompleks enzim-ligan juga dapat terlihat dalam plot kurva RMSD.

Kata Kunci : inhibitor, *molecular docking*, neuraminidase, peptida, simulasi dinamika molekul, virus influenza H1N1.

xvii + 101 halaman : 14 gambar ; 7 tabel

Daftar pustaka : 36 (2001-2010)

## ABSTRACT

Nama : Riski Imaniastuti

Program Study : Chemistry

Title : Molecular Dynamic Simulation of Neuraminidase Influenza A Virus Subtype H1N1 with Potential Inhibitor of Disulfide Cyclic Peptide (DNY, NNY, LRL)

Resistance of oseltamivir as an inhibitor of neuraminidase influenza A virus subtype H1N1 has been reported by Cheng, et al in 2009. To solve this problem, several researchs by molecular docking method have been conducted to design and discover disulfide cyclic peptide ligand which become potential inhibitors for neuraminidase H1N1 to inhibit the replication of this virus. This research was studied and evaluated the interaction of ligands toward enzyme in the hydrated state using molecular dynamics simulation at two different temperatures. Simulations performed on three disulfide cyclic peptide inhibitors namely DNY, LRL, NNT along with oseltamivir, zanamivir as a standard ligand. The result provided that dynamic movement of five proposed ligand in the hydrate state affecting ligand interaction of the enzyme amino acid residues. In the end of simulation, two of three disulfide cyclic peptide inhibitors have good interaction with catalytic site of the enzyme. At the end of simulation temperature of 300 K, DNY formed hydrogen bond with catalytic site Asp 151, Arg 293, LRL with Arg 118, Arg 293, NNY with Asp 151, Glu 425 and Arg 293. Then at the end of simulation temperature of 312 K, DNY could not form hydrogen bond with catalytic site of enzyme. LRL formed hydrogen bond with Asp 151, Glu 425, Tyr 402, NNY with Asp 151, Glu 278, and Arg 293. Different conformations of enzymes which occur during simulation showed the dynamic behaviour of the enzyme in the presence of solvent and inhibitor. The changing of enzymes conformation as the result of dynamic behaviour of the enzyme in the presence of solvent and inhibitor also could be seen in RMSD curve.

Key Words : inhibitor, molecular docking, neuraminidase, peptide, molecular dynamics simulation, H1N1 virus.

xvii + 101pages : 14 pictures ; 7 tables

Bibliography : 36 (2001-2010)



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Influenza adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus dan dapat menginfeksi manusia dan juga hewan. Secara umum, virus influenza merupakan virus yang memiliki penyebaran sangat spesifik terhadap spesies tertentu. Gejala umum penyakit ini adalah demam, sakit tenggorokan, sakit kepala, dan batuk. Dalam kasus yang lebih serius dapat menyebabkan kematian ( Kamps, Hoffman&Prieser, 2006)

Berdasarkan sifat-sifat antigeniknya , virus influenza memiliki dua glikoprotein permukaan fungsional yaitu haemagglutinin dan neuraminidase. Virus H1N1 merupakan subtype virus yang termasuk ke dalam tipe virus influenza A. Tipe virus ini terdiri atas 16 haemagglutinin (H1-H16) dan 9 neuraminidase (N1-N9). Sehingga secara teoritis ada 16 x 9 subtype, dan sampai sekarang telah ditemukan 105 subtype dari virus influenza A dan semuanya endemik pada burung air, namun demikian beberapa subtype telah ditemukan pada ayam dan mamalia (Michaelis et al., 2009).

Pada tahun 2009 virus influenza A subtype H1N1 menjadi pandemik, dengan strain virus baru diidentifikasi pada April 2009 dan dikenal sebagai “Swine flu”. Pandemi ini menyebabkan infeksi yang fatal dengan lebih dari 80 kematian di 40 negara, pertama dideteksi di Meksiko dan menyebar ke berbagai negara di Amerika Selatan dan Utara, Eropa, dan Asia ( <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>). Virus strain baru tersebut merupakan kombinasi dari segmen gen virus influenza dari babi, burung, dan manusia (Rungrotmongkol et al., 2009).

Saat ini virus influenza H1N1 memasuki fase post-pandemic ( pasca-pandemik). Virus ini akan berperilaku layaknya virus influenza musiman selama beberapa tahun mendatang, namun tidak berarti virus ini telah hilang.

[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html)

Virus influenza H1N1 tahun 2009 ini cukup familiar karena pernah menjadi penyebab pandemik “Spanish flu” pada tahun 1918, menginfeksi 5% dari populasi dunia dan menyebabkan kematian 20-50 juta penduduk. ( Wang et al., 2009)

Salah satu pencegahan terhadap infeksi virus H1N1 adalah dengan vaksinasi. Tetapi vaksin yang ada pada saat ini dianggap masih memiliki kelemahan dan kurang sempurna di dalam melindungi tubuh ketika terjadi virus influenza (Michaelis et al., 2009). Hal ini disebabkan oleh adanya mutasi dari virus tersebut. Mutasi ini bisa diakibatkan oleh *antigenic drift* maupun *antigenic shift*. (Michaelis et al., 2009).

Pada saat ini telah dikembangkan suatu antiviral sebagai pengganti metode vaksin. Salah satu antiviral komersial, yang dapat menghambat perkembangan virus H1N1, dalam hal ini inhibitor terhadap neuraminidase adalah oseltamivir dan zanamivir. Kedua obat antiviral tersebut direkomendasikan oleh Centers of Disease Control and Prevention (CDC) dan WHO (Rungrotmongkol et al., 2009). Oseltamivir merupakan salah satu obat antiviral yang mampu menghambat neuraminidase yang berfungsi dalam proses replikasi viral pada tahap terakhir siklus hidup viral. Interaksi antara oseltamivir dengan NA ditemukan dalam interaksinya dengan residu katalitik sisi aktif NA, ketika kerangka residu menstabilkan struktur enzim. Mutasi-mutasi pada residu NA menunjukkan adanya resistensi oseltamivir pada subtipe-subtipe spesifik virus (Rungrotmongkol et al., 2009).

Resistensi oseltamivir terhadap virus influenza tipe A (H1N1) dilaporkan di Eropa pada musim salju tahun 2007-2008. Isolate subtipe H1N1 diuji di 18 negara Eropa, 59 (13,5%) dari 437 isolat resisten terhadap oseltamivir dan memiliki substitusi oleh tirosin pada residu 274 (H274Y) pada gen neuraminidase (NA). Resistensi oseltamivir pertama kali terdeteksi di Hong Kong pada bulan Januari 2008, yang bertepatan dengan kemunculan virus claudie 2B A/Brisbane/59/2007. Dari bulan Januari hingga Juni 2008, 87 isolat (12,5%) dari 697 isolat diuji resistensi terhadap oseltamivir. Semua virus-virus tersebut memiliki mutasi H274Y pada gen NA dan menunjukkan reduksi hingga 1000 lipatan dalam kerentanan terhadap oseltamivir, yaitu peningkatan konsentrasi penghambatan dari 0,5 nmol/L menjadi 500 nmol/L ( Cheng et al., 2009)

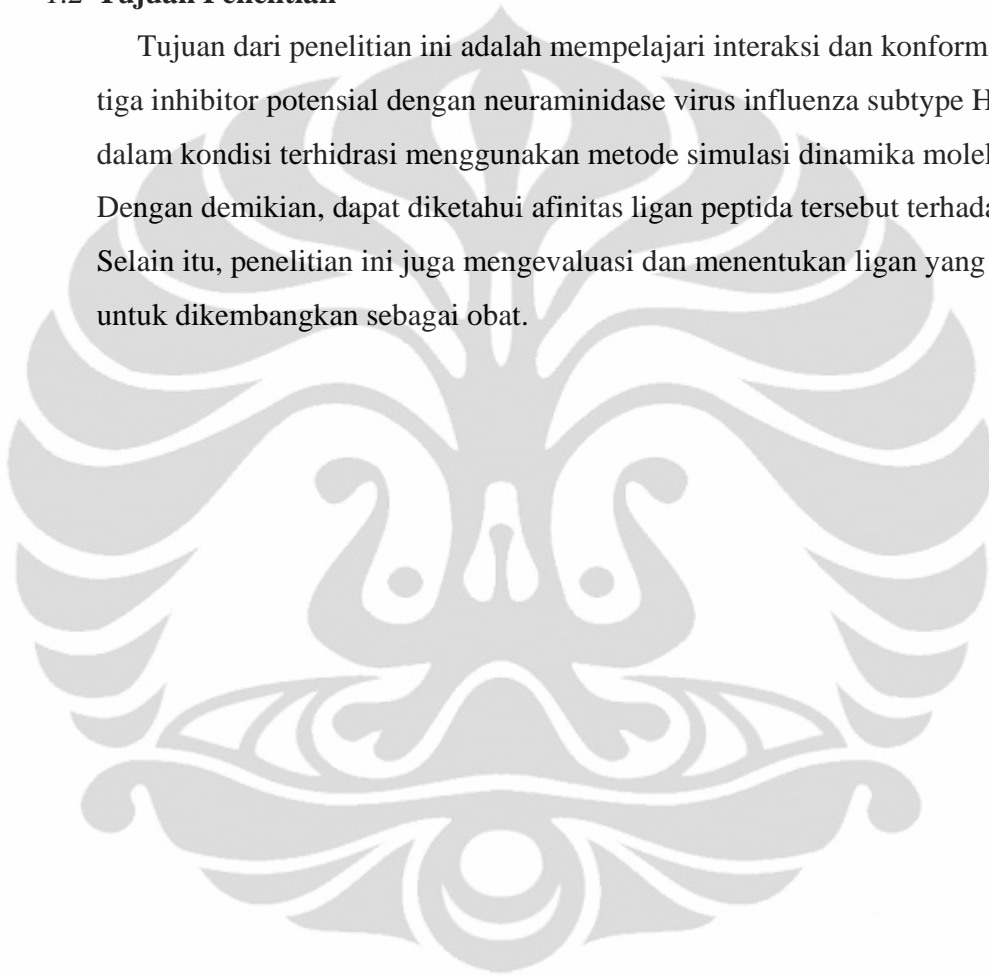
Resistensi oseltamivir yang sangat merugikan sebagai obat antiviral terhadap kerja enzim neuraminidase, memungkinkan dilakukan perancangan inhibitor neuraminidase baru. Penelitian yang telah dilakukan oleh Amri (2010) adalah perancangan ligan peptida siklis sebagai inhibitor potensial untuk enzim neuraminidase, dan menghasilkan 3 ligan terbaik yaitu DNY, NNY dan LRL. Penelitian secara komputasi tersebut dilakukan menggunakan metode molecular docking yang termasuk dalam molecular modeling. Dengan molecular modeling dapat dirancang dan ditampilkan struktur serta sifat-sifat molekul tertentu dengan menggunakan teknik kimia komputasional dan visualisasi grafis (Leach, 2001).

Pada metode molecular docking enzim berada dalam keadaan rigid, sedangkan ligan berada dalam kondisi yang fleksibel. Namun pada kenyataannya, biomolekul seperti protein berada dalam kondisi yang dinamis (Nurbaiti, 2009). Dalam mendesain suatu obat, perlu dipertimbangkan pengaruh pelarut. Hal tersebut dikarenakan obat yang telah dirancang akan dikonsumsi ke dalam tubuh yang kebanyakan mengandung air. Pelarut diikutsertakan dalam sistem sehingga akan terjadi perilaku yang dinamis pada kompleks enzim-ligan yang memungkinkan terjadinya perubahan interaksi diantara keduanya. Untuk mengetahui perubahan interaksi tersebut dilakukan simulasi dinamika molekul

(*molecular dynamic simulation*) yaitu metode komputasi yang dapat memberikan keadaan fleksibel pada enzim dan ligan serta dapat mempertimbangkan pengaruh pelarut.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari interaksi dan konformasi dari tiga inhibitor potensial dengan neuraminidase virus influenza subtype H1N1 dalam kondisi terhidrasi menggunakan metode simulasi dinamika molekul. Dengan demikian, dapat diketahui afinitas ligan peptida tersebut terhadap enzim. Selain itu, penelitian ini juga mengevaluasi dan menentukan ligan yang potensial untuk dikembangkan sebagai obat.





## BAB 2

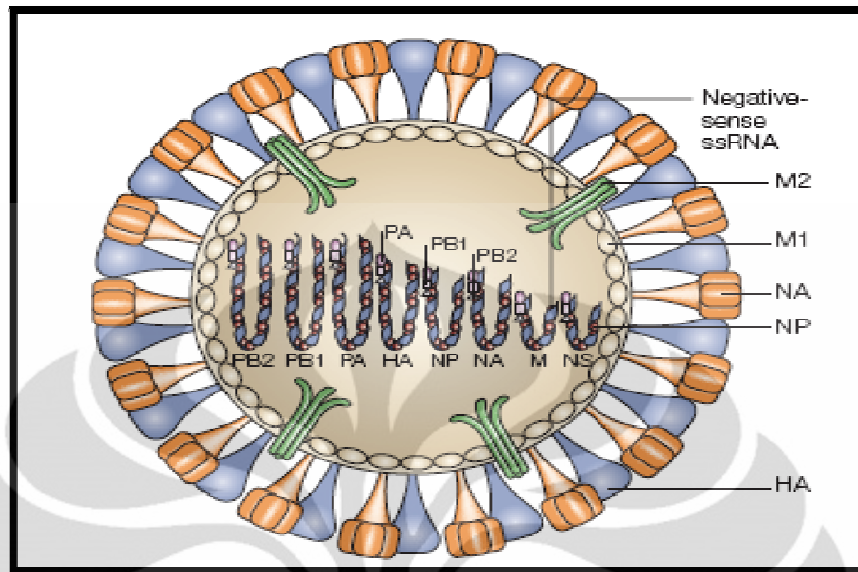
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Virus Influenza

Virus influenza merupakan virus yang termasuk kedalam famili *Orthomyxoviridae* yang mempunyai selubung (envelope) dengan genom RNA berupa rangkaian tunggal berpolaritas negatif (negative sense) sebanyak 7-8 segmen. Pada manusia virus ini dapat menyebabkan demam, pusing, batuk dan dalam beberapa kasus serius, menyebabkan *pneumonia* pada anak-anak dan orang dewasa hingga menyebabkan kematian (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006)

Antigen virus influenza tersusun atas beberapa komponen. Komponen pertama adalah antigen internal yang terdiri atas RNA dan protein M. Komponen kedua adalah antigen eksternal permukaan glikoprotein yang tersusun dari hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Perbedaan sifat antigen internal dari nukleokapsid protein (NP) dan matriks protein (MP) menjadi dasar dari pembagian virus influenza menjadi tipe A, tipe B, dan tipe C. Virus influenza A dan B terdiri dari delapan segmen RNA sedangkan virus influenza C hanya terdiri dari tujuh segmen. Virus influenza A dapat menginfeksi unggas maupun mamalia (termasuk manusia) dan bersifat pathogen terhadap hospesnya, sedangkan virus influenza B dan C dapat diisolasi dari mamalia dan umumnya kurang pathogen dibandingkan virus influenza tipe A (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006)

Antigen eksternal permukaan glikoprotein yang tersusun dari hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) menjadi dasar pengelompokkan lebih lanjut influenza A menjadi beberapa subtipe. Virus influenza A mempunyai 16 jenis hemagglutinin dan 9 neuraminidase. (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006)



**Gambar 2.1 Struktur Virus Influenza**

[ Sumber : Horimoto, T et al, 2005]

## 2.2 Hemagglutinin (HA)

Hemagglutinin merupakan glikoprotein homotrimer yang memiliki tiga *glycosylation site* (situs glikosilasi) dengan berat molekul sekitar 76.000. Hemagglutinin ini mengelilingi membrane lipid pada sisi luarnya dan memiliki setidaknya 5 daerah antigenik (epitope) yaitu A,B (membawa receptor binding site), C, D, dan E. *Antigenic sites* berada di puncak dari molekul HA sedangkan bagian bawahnya mengikat lipid layer. Bagian tengah HA memiliki *stalk region* dan *fusiogenic domain* ketika menginfeksi sel baru (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

Hemagglutinin memiliki 2 fungsi utama, yaitu untuk mengenali sel target pada vertebrata yang akan berikatan dengan virus dan membantu masuknya genom viral ke dalam sel melalui penggabungan membran endosom pada host dengan membran viral. Hemagglutinin inilah yang nantinya akan berikatan dengan *sialic acid* (N-acetylneuraminic acid) (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

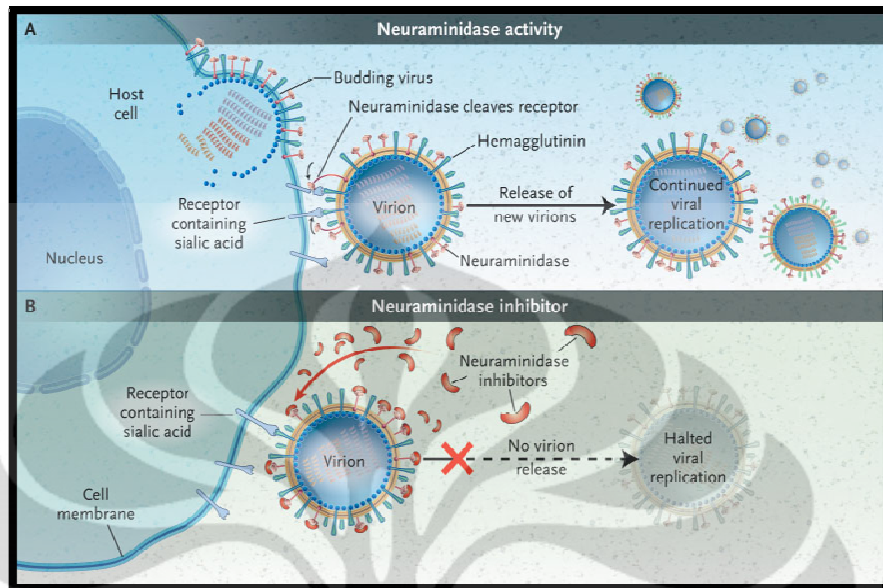
### 2.3 Neuraminidase (NA)

Neuraminidase merupakan glikoprotein seperti hemagglutinin yang berada di permukaan virus membentuk struktur tetramer dengan rata-rata berat molekul 220.000 (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006). Neuraminidase berfungsi sebagai enzim yang dapat menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan *sialic acid* pada rantai ujung oligosakarida-glikoprotein. Fungsi lain dari neuraminidase adalah untuk melepaskan partikel virus yang sudah selesai direplikasi dalam sel host dan mencegah virus yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor *sialic acid* melalui tongkolan hemagglutinin (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

Neuraminidase merupakan molekul target dari senyawa inhibitor neuraminidase yang akan memotong reseptor selular *sialic acid*. Pemotongan ini melepaskan virus-virus, yang nantinya akan menjangkit sel baru. Tanpa neuraminidase, infeksi akan dibatasi pada satu putaran replikasi, yang cukup jarang menyebabkan penyakit. Neuraminidase juga memfasilitasi invasi viral bagian atas, kemungkinan dengan memotong *sialic acid* menjadi setengahnya pada mucin yang mengelilingi sel epitel bagian atas. Kemampuan pada keadaan transisi analog dengan *sialic acid* dalam menghambat neuraminidase virus influenza, yang pertama kali dikenal pada tahun 1970. Namun desain inhibitor yang efektif dapat dilakukan dengan analisis struktur 3 dimensi neuraminidase virus influenza terbuka baik lokasi maupun struktur sisi katalitiknya (Moscona, 2005)

Inhibitor neuraminidase mirip dengan substrat alami neuraminidase, dan inhibitor ini akan berikatan dengan sisi aktif untuk menghalangi enzim yang akan memotong reseptor sel inang. Dengan demikian, hal ini dapat mencegah infeksi sel-sel inang yang baru dan menghentikan penyebaran infeksi (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).





**Gambar 2.2 Mekanisme Inhibitor Neuraminidase**

[sumber : [www.nejm.org](http://www.nejm.org). diakses Januari 2011]

#### 2.4 Protein Matriks (M)

Gen matriks dari virus influenza A menyandi dua macam protein, yaitu protein 1 (M1) dan protein matriks 2 (M2). Protein matriks berperan dalam penyusunan virion virus influenza. Bersama dengan protein hemagglutinin dan neuraminidase, protein matriks 2 menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion. Protein 2 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan dalam proses awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dari *ribonucleoprotein* (RNP) untuk masuk ke dalam sitoplasma sel host. Pemisahan ini dipicu pemindahan ion hidrogen melewati membran virus oleh protein matriks 2 (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

## **2.5 Polymerase A protein (PA), Polymerase B1 protein (PB1), dan Polymerase B2 protein (PB2)**

Virus influenza A terdiri atas 8 *negatif native-strand sequence* DNA genom yang dikode oleh 11 protein. *Polymerase* influenza merupakan sebuah heterotrimerik ~250 kD terdiri atas 3 protein kompleks, yaitu PA, PB1, dan PB2. Protein PA, PB1, dan PB2 merupakan RNA *polymerase* aktif yang mampu melakukan replikasi dan transkripsi. Fungsi dari protein ini adalah sebagai enzim yang akan menggandakan rantai RNA pada virus pada saat terjadi replikasi di dalam sel inang (vRNA→cRNA→vRNA) (Liu et al., 2009).

Karakterisasi interaksi RNA *polymerase* dengan ekstensif mutagenesis menunjukkan PB1 N-terminal 25 residu terikat pada C-terminal PA.

## **2.6 Protein NS1 dan NS2**

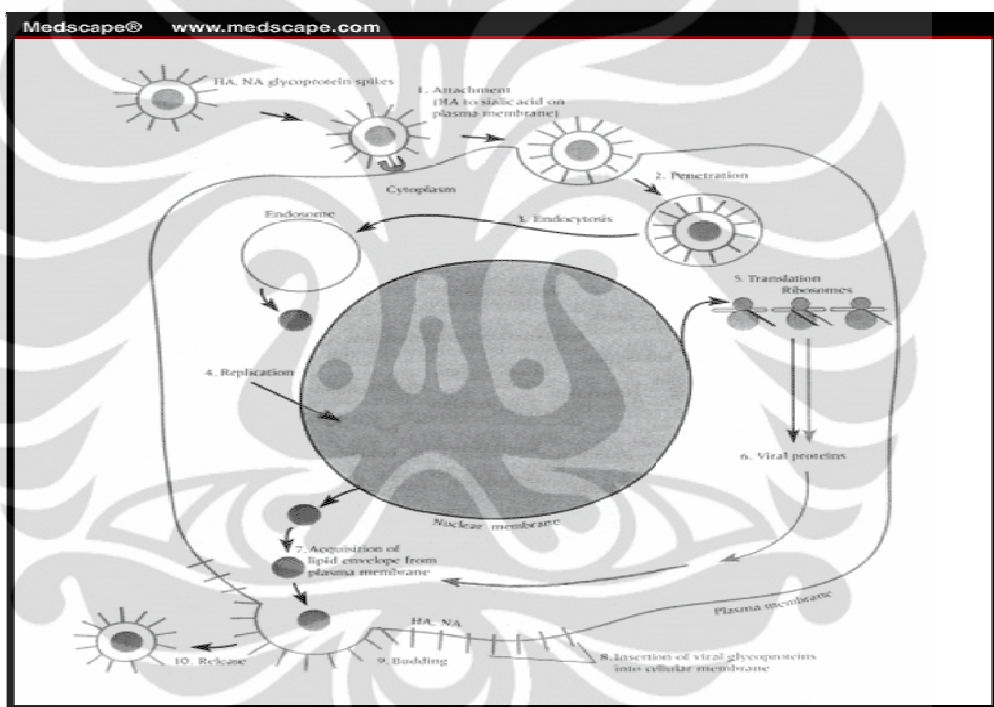
Protein NS1 merupakan mRNA yang memiliki bobot molekul 26000. Protein ini akan membantu transport viral RNA ke ribosom untuk ditranslasikan. Sedangkan NS2 merupakan molekul yang lebih kecil dengan bobot molekul 11000. Protein ini dipercaya memiliki fungsi memfasilitasi transport RNP yang baru disintesis dari inti sel menuju sitoplasma, untuk mempercepat penggandaan virus (Kamps, Hoffman, & Preiser, 2006).

## **2.7 Mekanisme Replikasi Virus Influenza**

Replikasi virus terdiri atas beberapa tahap. Tahap pertama hemagglutinin virus influenza terikat pada gula *sialic acid* pada bagian permukaan sel, umumnya pada bagian hidung dan paru-paru dari mamalia atau burung. Tahap kedua virus masuk ke dalam sel melalui endositosis, dalam keasaman endosom haemagglutinin dari virus berdifusi memasuki dan melepaskan molekul viral RNA (vRNA), protein aksesoris, dan RNA-*polymerase* ke dalam sitoplasma. Tahap ketiga protein yang dilepaskan pada tahap kedua dan vRNA menuju inti sel dan RNA *polymerase* mulai

mentranskripsikan rantai komplementernya (vRNA dikopi dari (-) sense menjadi (+) cRNA dan mRNA).

Tahap keempat vRNA dikeluarkan kembali ke dalam sitoplasma dan mulai ditranslasikan. Tahap kelima viral protein yang baru terbentuk kembali lagi ke inti sel untuk membentuk vRNA atau viral protein yang baru terbentuk dikeluarkan menuju apparatus golgi pada permukaan selnya. Tahap keenam vRNA dan inti viral meninggalkan inti sel menuju membran. Tahap terakhir virus meninggalkan sel dan membentuk virus baru.



**Gambar 2.3. Mekanisme replikasi virus influenza**

[Sumber: <https://www.medscape.com> diakses Januari 2011].

## 2.8 Mutasi Virus Influenza

Mutasi merupakan perubahan susunan genetika yang mengakibatkan terbentuknya struktur baru. Pada virus mutasi umumnya terjadi pada saat terjadinya replikasi di dalam sel *host*. Pada saat pengkopian rantai RNA kadang terjadi kesalahan yang disebabkan oleh adanya proses replikasi lain yang berlangsung di dalam sel yang sama sehingga menghasilkan susunan RNA yang baru dan akan

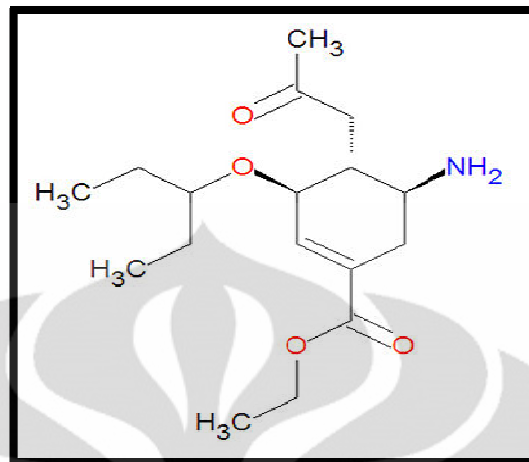
terbentuk virus dengan genetika yang baru pula. Jika mutasi ini menyebabkan virus menjadi kebal terhadap antibodi maka akan terjadi virus yang baru yang lebih berbahaya.

Mutasi yang terjadi pada antigen akan mengurangi atau mencegah penetralan oleh antibodi, hal ini memungkinkan terjadinya subtipe baru yang menyebar dalam populasi non-imun. Fenomena ini dikenal dengan “*antigenic drift*”. Respon imun terhadap antigen HA diikuti produksi antibodi penetralan yang merupakan dasar penyembuhan infeksi oleh setiap individu (Gurtler et al., 2007).

*Antigenic shift* merupakan perpindahan antigen yang terjadi pada saat sebuah sel terinfeksi 2 virus yang berbeda tipe. Genom ini mengalami pertukaran pada saat terjadi replikasi di dalam sel, misalnya H1 yang digantikan oleh H5 yang menghasilkan virus influenza dengan subtipe baru (Gurtler et al., 2007).

## **2.9 Neuraminidase Inhibitor**

Neuraminidase pada virus influenza merupakan suatu glikoprotein yang memiliki peran dalam pelepasan virus dari sel yang terinfeksi dan pada disagregasi dari partikel virion. Senyawa analog dari substrat alami NA yaitu *sialic acid* dapat dijadikan suatu inhibitor untuk fungsi sialidase dari NA. Kebanyakan dari derivat awal yang ditemukan tidak begitu cocok sebagai agen *therapeutic*. Sekarang telah banyak ditemukan analog baru dari *sialic acid* yang didesain berdasarkan struktur kristal dari NA, telah dilaporkan dan digunakan secara umum antara lain oseltamivir dan zanamivir.



**Gambar 2.4. Struktur Oseltamivir**

[Sumber : [www.influenzareport.com/ir/drugs/oselta.htm](http://www.influenzareport.com/ir/drugs/oselta.htm)]

Interaksi yang terjadi antara oseltamivir dengan NA dilihat dari interaksi gugus yang terdapat pada oseltamivir dengan residu-residu pada sisi aktif NA. Ikatan-ikatan yang terjadi adalah suatu ikatan elektrostatis atau ikatan hidrogen antara atom oksigen dari gugus asetamida (C4) dengan guanidyl group dari residu Arg137 pada N1hA atau Arg 152 pada 2Hu0 dan gugus metil dari asetamida tersebut menempati suatu sisi hidrofobik. Lalu terdapat interaksi antara anion karboksil dari oseltamivir dengan tiga residu arginin yaitu Arg103, Arg278, dan Arg353 yang memiliki muatan positif. Sementara itu rantai samping alkil dari C3 pentyloxy group menempati suatu sisi hidrofobik yang terbentuk dari ikatan hidrokarbon residu Glu262, Ser232, Arg210 dan Ile208 pada N1hA atau Glu276, Ser246, Arg224, dan Ile222 pada 2Hu0. Untuk gugus amino pada C5 group dari oseltamivir membentuk ikatan hidrogen dengan residu Asp151 dan Glu119 ( Zhang, Qingye, et al., 2008).

### **2.10 Drug Design dan Drug Development**

*Drug design* adalah suatu metode perancangan obat yang didasarkan pada analisis biologis dan fisik dari targetnya. Targetnya merupakan molekul-molekul atau bagian dari makro molekulnya yang berperan vital di dalam proses metabolik dari kondisi patologis seseorang akibat penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen.

Umumnya obat ini dirancang untuk menginhibisi atau menghentikan makromolekul tersebut dengan cara membentuk ikatan terhadap sisi aktif dari molekul-molekul tersebut sehingga molekul obat berperan sebagai inhibitor. Hal yang harus dipertimbangkan di dalam merancang inhibitor sebagai obat, antara lain adalah spesifitas dan potensi inhibisinya.

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

*Drug development* merupakan suatu proses panjang di dalam penentuan, perancangan, pembuatan, dan penjualan suatu obat. Proses ini termasuk di dalamnya adalah proses penelitian pra-klinis yakni pengujian terhadap mikroorganisme atau hewan dan proses percobaan klinis terhadap manusia. Percobaan klinis terdiri atas empat fase. Suatu proses pembuatan obat hingga obat tersebut dapat diproduksi membutuhkan banyak biaya dan waktu.

### **2.11 Peptida Drug Design**

Peptida merupakan gabungan beberapa asam amino yang terbentuk secara kovalen melalui ikatan peptida. Ikatan peptida ini terjadi akibat reaksi kondensasi hilangnya molekul air yang berasal dari gugus karboksil satu asam amino dan gugus asam amino lainnya (Lehninger, 2004).

Akhir-akhir ini peptida telah dikembangkan dalam *drug design*. Peptida dapat disintesis melalui metode rekombinan atau modifikasi senyawa dari produk alami. Walaupun molekul peptida memiliki kestabilan yang rendah, tetapi peptida lebih disukai sebagai obat karena peptida memiliki aktivitas dan spesifitas yang tinggi, toksisitas yang rendah serta relatif tidak terakumulasi di dalam tubuh (Sehgal, 2006).

**Tabel 2.1 Kelebihan dan kekurangan peptida sebagai drug**

<b>Kelebihan</b>	<b>Kekurangan</b>
Aktivitas tinggi	Kurang stabil
Spesifitas tinggi	Mudah terdegradasi oleh protease
Cenderung tidak terakumulasi dalam tubuh	Proses sintesis membutuhkan biaya yang tinggi
Toksistas rendah	Bioavailabilitas oral rendah
Efisiensi tinggi	Harus disintesis dalam jumlah besar
Tidak ada <i>drug-drug interaction</i>	

## 2.12 Bioinformatika

Bioinformatika merupakan gabungan ilmu antara ilmu biologi dan teknik informatika. Bioinformatika melakukan analisa data genomik, proteomik yang kompleks, untuk menghasilkan pengetahuan biologi molekuler yang koheren.

Bioinformatika merupakan bidang ilmu yang menggunakan pendekatan komputasional untuk menyelesaikan persoalan biologis. Bioinformatika meliputi pengelolaan informasi biologis yang diperoleh dari berbagai penelitian yang menghasilkan data dalam jumlah banyak dan kompleks, seperti pemetaan genom manusia. Bioinformatika mampu memberikan prediksi maupun simulasi dengan mempertimbangkan hubungan serta pola data biologis (Baxevanis dan Oullete, 2001)

## 2.13 Database

Database adalah suatu kumpulan data-data yang diatur sedemikian rupa untuk memudahkan penggunaannya. Pada database bioinformatika, data yang diatur merupakan data sekuen DNA atau protein yang didapat melalui percobaan laboratorium yang biasanya disimpan dalam file komputer. Setiap file dari suatu sekuen berisi informasi mengenai asal organisme, nama sekuen, dan juga nomor akses yang digunakan untuk mengidentifikasi sekuen tersebut (Mount, 2004).

GenBank merupakan suatu institusi yang menyimpan dan mengelola database urutan DNA suatu gen dan ekspresi asam aminonya. Urutan DNA diperoleh dari berbagai penelitian yang dengan sukarela memberikan hasil penelitiannya untuk masyarakat umum. GenBank didirikan oleh National Center for Biotechnology Information (NCBI) bersama dengan DNA Data Bank of Japan (DDBJ) dan European Bioinformatics Institute (EBI). Diantara format-format database yang ada, GenBank Flatfile Format (GBFF) dan FASTA merupakan format umum digunakan pada bioinformatika. (Baxevanis dan Oullete, 2001).

#### **2.14 GenBank Flatfile Format (GBFF)**

Format GBFF memiliki tiga bagian terpisah yaitu header, feature, dan sekuen. Bagian header berisi tentang informasi identitas organisme asal sekuen nukleotida atau asam amino seperti nama gen, waktu publikasi, nomor akses, produk ekspresi, dan nama peneliti yang memetakan sekuen nukleotida tersebut. Bagian feature memuat nama genus, spesies, jaringan, kromosom, galur, dan organisme asal sekuen beserta daerah gen, urutan asam amino yang disandi, dan nomor identitas produk proteinnya. Bagian terakhir GBFF merupakan bagian yang berisi susunan lengkap sekuen nukleotida atau protein dari organisme yang bersangkutan (Baxevanis dan Oullete, 2001).

#### **2.15 Format FASTA**

Format FASTA terdiri atas definition line dan sekuen asam amino atau nukleotida. Format ini merupakan format input (query sequence) untuk berbagai program analisis bioinformatika. Format FASTA tergolong kurang informatif dibandingkan format lainnya, namun format ini lebih praktis jika dalam analisis sekuen (Baxevanis dan Oullete, 2001).



## 2.16 Format PDB

Format file yang berbasis teks yang memetakan koordinat dari suatu molekul sehingga dapat menggambarkan struktur tiga dimensi dari suatu molekul. Mayoritas informasi yang disimpan dalam format PDB adalah struktur tiga dimensi dari protein. Selain memetakan koordinat dari suatu molekul, format PDB juga dapat memuat informasi tentang peneliti yang telah memetakan struktur molekul tersebut (Baxevanis dan Oullete, 2001).

## 2.17 Format PDBQT

Format file PDBQT merupakan suatu penyempurnaan dari format file PDB. Maksud dari format file PDBQT adalah file reseptor (target enzim) atau ligand (inhibitor) yang telah memiliki partial charges (Q) dan atom types (T) (Department of Chemistry and Biochemistry, Concordia University).

## 2.18 Sequence Alignment

Metoda penjajaran dua atau lebih sekuen nukleotida atau asam amino menggunakan algoritma tertentu dengan bantuan computer, sehingga didapatkan area yang memiliki urutan relatif identik satu sama lain. Metode ini berfungsi mencari kesamaan (*conserve region*) dan homologi antara *sequence* nukleotida DNA. Konservitas menunjukkan adanya hubungan evolusi antara dua atau lebih sekuen nukleotida yang mengalami perubahan akibat substitusi, insersi, dan delesi (Baxevanis dan Oullete, 2001).

*Sequence Alignment* dibagi menjadi dua jenis berdasarkan jumlah sekuen yang digunakan sebagai input. *Pairwise sequence alignment* melibatkan dua sekuen, sedangkan *multiple sequence alignment* melibatkan lebih dari dua macam sekuen. *Multiple sequence alignment* memberikan hasil yang lebih akurat dan representatif dibandingkan *pairwise sequence alignment* karena peningkatan jumlah input sekuen meningkatkan kepercayaan dan akurasi output. Peningkatan jumlah sekuen yang dimasukkan berarti meningkatkan kompleksitas proses *sequence alignment* (Baxevanis dan Oullete, 2001).

## 2.19 Molecular Modeling

*Molecular modeling* merupakan suatu teknik untuk merancang dan menampilkan struktur dan sifat – sifat molekul tertentu dengan menggunakan teknik kimia komputasional dan teknik visualisasi grafis. *Molecular modelling* juga merupakan gabungan dari data empiris dan teknik komputasional untuk menirukan dan memodelkan perilaku molekul sehingga dapat digunakan untuk mempelajari sistem molekular suatu molekul tertentu (Leach, 2001).

Kimia komputasi atau pemodelan molekuler adalah suatu ilmu dari struktur molekul secara numerik dan simulasi perilaku struktur molekul tersebut dengan persamaan kuantum dan fisika klasik. Program kimia komputasi memungkinkan ilmuwan untuk menghasilkan dan menyajikan data termasuk geometri molekul, sifat elektronik dan properti spektroskopi.

Terdapat tiga jenis penggunaan yang biasanya digunakan dalam molecular modeling, yaitu : analisis struktur, *homology modeling*, dan *molecular docking*. Adapun tujuan dari penggunaan teknik ini adalah menyediakan struktur geometri tiga dimensi yang sesuai dengan parameter kondisi yang telah ditentukan (Bian, 2009).

## 2.20 Molecular Docking

*Molecular docking* adalah suatu teknik yang digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul. *Molecular docking* dapat memprediksikan orientasi dari suatu molekul ke molekul yang lain ketika berikatan membentuk kompleks yang stabil. Terdapat dua aspek penting dalam molecular docking, yaitu fungsi scoring dan penggunaan algoritma (Funkhouser, 2007).

Metode untuk mencari posisi optimal ligand terhadap sisi aktif pengikatan dari struktur target (reseptor). *Molecular Docking* dapat memprediksi afinitas pengikatan kompleks yang terbentuk antara reseptor dengan ligand menggunakan berbagai parameter seperti *agro binding*, konstanta inhibitor, ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik. *Molecular Docking* sangat berguna dalam proses perancangan obat, seperti untuk memprediksi afinitas pengikatan dari inhibitor yang didesain

terhadap enzim tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya (Yeturu & Nagasuma , 2008).

Fungsi *scoring* dapat memperkirakan afinitas ikatan antara makromolekul dengan ligan (molekul kecil yang memiliki afinitas terhadap makromolekul). Identifikasi ini didasarkan pada beberapa teori seperti teori energi bebas Gibbs. Nilai energi bebas Gibbs yang kecil menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk stabil, sedangkan nilai energi bebas Gibbs yang besar menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk kurang atau tidak stabil. Sedangkan penggunaan algoritma berperan dalam penentuan konformasi (*docking pose*) yang paling stabil (*favourable*) dari pembentukan kompleks (Funkhouser, 2007). Berdasarkan pada interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *molecular docking*, yaitu (1) *Docking* protein-protein, (2) *Docking* ligan-protein, dan (3) *Docking* ligan-DNA.

Untuk melakukan *molecular docking*, hal pertama yang dibutuhkan adalah struktur tiga dimensi dari ligan (drug) dan protein target. Struktur tiga dimensi ligan dapat dimodelkan dengan menggunakan teknik *molecular modelling* sedangkan struktur tiga dimensi protein target dapat ditentukan secara empiris dengan menggunakan teknik NMR spectroscopy dan x-ray crystallography yang terdapat pada database protein data bank dan secara *in silico* dengan homology modelling (Lucientes, 2004).

### **2.21 Molecular Dynamics (MD)**

*Molecular dynamics* adalah suatu bentuk simulasi komputer di mana atom dan molekul yang diizinkan untuk berinteraksi selama jangka waktu tertentu dengan pendekatan secara fisik yang diketahui, memberikan pandangan dari gerak dan partikel. *Molecular dynamics* merupakan tahapan lebih lanjut dari pendekatan *molecular mechanic* dan didasari dari ide bahwa atom dari suatu molekul merasakan kekuatan untuk bergerak. Simulasi *molecular dynamics* menyediakan pendekatan yang baik untuk menentukan konformasi molekul terbaik. Hal ini didapatkan dengan

melakukan simulasi dari pergerakan dinamik suatu molekul yang bervibrasi dan berotasi.

Proses pelarutan biomolekul yang akan disimulasikan bertujuan agar proses simulasi mendekati sistem nyata. Dua jenis sistem solvasi yang biasa dipergunakan pada simulasi *molecular dynamics*, yaitu sistem implisit dan eksplisit (Becker *et al.*, 2001). Pada sistem implisit, molekul pelarut hanya berperan sebagai medium dan tidak terlalu terlibat di dalam suatu proses simulasi. Pada sistem ini pengaruh pelarut dimodelkan dengan menggunakan pelarut kontinyu. Posisi pelarut digantikan dengan suatu tetapan dielektrik kontinyu. Sedangkan pada sistem solvasi eksplisit, molekul protein secara nyata dikelilingi oleh molekul air.



## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat PC computer intel dual core, yang ditunjang dengan akses internet untuk menjalin koneksi dengan program yang online.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah berupa software bioinformatika. Software tersebut antara lain ACDlabs, Vegazz, MOE 2008.10 . Program online yang digunakan antara lain Swiss-Model Workspace (Swiss Institute of Bioinformatics & the Biozentrum University of Basel).

#### **3.2 Lingkup Kerja**

Lingkup kerja pada penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

##### **3.2.1 Pencarian sekuen data neuraminidase Virus Influenza A (H1N1)**

Sekuen neuraminidase influenza H1N1 yang digunakan dalam penelitian ini dapat diunduh dari database yang ada di NCBI melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/flu/> dengan menggunakan perangkat komputer yang terhubung dengan *internet*. Sistem operasi yang digunakan adalah *Microsoft Windows XP* dengan broser *Mozilla Firefox 2.0*. Sekuen neuraminidase yang digunakan memiliki kode *genbank* ACR08499.1. Penggunaan sekuen dengan kode tersebut didasarkan penelitian yang telah dilakukan Amri tahun 2010.

##### **3.2.2 Homology modeling neuraminidase Virus Influenza (H1N1)**

Pencarian struktur tiga dimensi *Homology Modeling* dapat dilakukan dengan menggunakan SWISS MODEL yang dapat diakses melalui <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>. Struktur tiga dimensi yang diperoleh merupakan hasil perbandingan dengan suatu template (struktur

pembandingan) dari database situs resmi PDB ( Protein Data Bank). Data struktur tiga dimensi neuraminidase diunduh dengan format PDB.

### **3.2.3 Visualisasi Sisi Katalitik Neuraminidase Influenza A (H1N1)**

Visualisasi sisi katalitik neuraminidase Influenza A (H1N1) dilakukan dengan *MOE 2008.10* dengan program Map. Sisi katalitik enzim terdiri atas beberapa sisi yang ditunjukkan dengan adanya beberapa sisi residu.

### **3.2.4 Perancangan Struktur Tiga Dimensi Ligan Peptida**

Sekuen asam amino peptida siklis yang telah dirancang lalu dimodelkan ke dalam struktur tiga dimensi. Pemodelan ini dilakukan dengan menggunakan software ACDlabs. Struktur peptida siklis tersebut dibuat dalam bentuk zwitter ionnya.

Hasil perancangan peptida siklis 3 dimensi kemudian disimpan dalam format MDL Mofile. Format penyimpanan peptida siklis kemudian dirubah menjadi MDL Mol dengan menggunakan software Vegazz. Dalam penyimpanan data dilakukan pada software *MOE 2008.10* dengan memasukkan semua rancangan peptida siklis ke dalam *MOE database viewer (dv)* dengan format .mdb.

### **3.2.5 Preparasi File *Molecular Docking***

Preparasi file *docking* dilakukan optimasi geometri dan minimisasi energi struktur 3 dimensi peptida siklis dan neuraminidase dengan menggunakan software *MOE 2008.10* yang dijalankan pada single computer Intel Pentium Dual Core.

#### **3.2.5.1 Optimasi Geometri dan Minimasi Neuraminidase**

Proses optimasi geometri dan minimasi energi struktur tiga dimensi neuraminidase dilakukan dengan menggunakan *software MOE*. Langkah pertama adalah protonasi dengan program protonate 3D. Kemudian dilakukan penambahan atom hidrogen pada struktur enzim dengan hidrogen fix, pengaturan muatan parsial enzim dengan partial charge dan optimasi dengan force field MMFF94x. Saat optimasi, solvasi enzim dalam bentuk gas phase dan dilakukan fix charge dengan

RMS gradient 0,05 kcal/mol Å. Parameter lainnya menggunakan default dan file output dalam format.moe.

### 3.2.5.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur 3 Dimensi Peptida

#### Siklis

Optimasi peptida siklis dilakukan pada MOE database viewer (dv) dengan format .mdb. Proses optimasi diawali dengan melakukan wash untuk seluruh peptida siklis (yang selanjutnya disebut ligan). Kemudian dilakukan pengaturan muatan parsial ligan menggunakan partial charge, dengan parameter method yang digunakan adalah MMFF94. Solvasi yang digunakan selama proses optimasi ligan adalah dalam bentuk gas phase. Lalu selanjutnya dilakukan proses minimisasi energi dengan RMS gradient 0.001 kcal/Å mol dan proses pengaturan interaksi ligan dengan enzim menggunakan protein-ligand Interaction Fingerprint (PLIF) yang dilakukan pada ligan. Parameter yang lainnya menggunakan default dan file output dalam format .mdb.

### 3.2.6 Molecular Docking

Proses *molecular docking* dilakukan dengan *software* MOE 2008.10 program MOE-*Simultation dock*. Proses *docking* diawali dengan preparasi *file docking*, pada proses preparasi ini baik inhibitor peptida siklis ( untuk kemudian disebut ligan) maupun enzim, keduanya ditambahkan hidrogen polar dan muatan *Forcefield* sedangkan hidrogen non polarnya di *merge*. *File ligan* disimpan dalam format.mol dan neuraminidase disimpan dalam format.moe, selanjutnya dilakukan preparasi parameter. Metode penempatan menggunakan triangel marcher dengan pengulangan pembacaan energi tiap posisi 1.000.000 dan parameter lain yang ada dalam MOE. Selanjutnya *scoring function* menggunakan london dG, *refinment forcefield* dengan konfigurasi pengulangan populasi 1000. Pengulangan yang pertama sebanyak 100 kali dan pengaturan kedua hanya ditampilkan satu hasil terbaik dari 100 pengulangan.

### 3.2.7 Analisis *Molecular Docking*

#### 3.2.7.1 Nilai Energi Bebas Ikatan ( $\Delta G_{\text{binding}}$ )

Energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi dilihat dalam format *viewer.mdb*. Kompleks enzim-ligan yang dipilih adalah kompleks yang memiliki nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi yang terkecil untuk kemudian dianalisa lebih lanjut.

#### 3.2.7.2 Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen yang terjadi pada kompleks enzim-ligan terbaik hasil docking diidentifikasi dan dianalisis dalam 3 dimensi dengan menggunakan software MOE dan sebelumnya dilakukan minimisasi energi hasil *docking* pada kandidat dengan nilai  $\Delta G_{\text{binding}}$  terendah. Format *file input* yang digunakan untuk identifikasi dan analisis adalah *.mdb*.

#### 3.2.7.3 Kontak Residu

Kontak residu kompleks enzim-ligan hasil *docking* diidentifikasi menggunakan *software* MOE 2008.10 dan program ligan interaction. Format *file input* yang digunakan untuk identifikasi dan analisis adalah *.moe*.

### 3.2.8 Preparasi *File Simulasi Dinamika Molekul*

Preparasi *file* simulasi dinamika molekul dilakukan optimasi geometri dan minimisasi energi struktur 3 dimensi peptida siklis dengan menggunakan *software* MOE 2008.10 yang dijalankan pada *single computer Intel Pentium Dual Core*. Optimasi geometri *partial charge* kompleks enzim-ligan dilakukan dengan parameter *method* yang digunakan adalah *current forcefield*. Selanjutnya dilakukan minimisasi energi dengan *forcefield* MMFF94x, solvasi yang digunakan adalah *born*, dan RMS gradient 0.05 kkal/mol Å. Parameter yang lainnya menggunakan *default* dan *file output* dalam format *.moe*.



### 3.2.9 Simulasi Dinamika Molekul

Proses *simulasi dinamika molekul* terhadap ligan inhibitor, dilakukan dengan *software* MOE 2008.10 program MOE-*dynamics*. Parameter yang digunakan sesuai dengan *default* pada MOE-*dynamics*, yaitu ensemble NVT (N: jumlah atom; V: volume; T: temperatur) dengan algoritma NPA. Parameter lainnya sesuai dengan *default* pada MOE-*dynamics*. Selanjutnya dilakukan analisis hasil dinamik kompleks enzim inhibitor berdasarkan pada hasil perhitungan simulasi dinamika molekul. Penentuan waktu kestabilan konformasi kompleks enzim terhadap pelarut dilakukan selama 100 piko detik pada tahap inisialisasi. Simulasi dilakukan selama 5000 piko detik, pada temperatur 300K (*default* MOE) dan 312K (kondisi temperatur demam pada manusia)

#### 3.2.9.1 Simulasi Dinamika Molekul pada temperatur 300 K

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada enzim dan kompleks ligan-enzim dengan suhu 300 K dan waktu simulasi selama 5000 piko detik. Ligan yang dimaksud adalah ligan peptida terbaik dan ligan pembanding. Tahapan selanjutnya dilakukan *cooling* selama 20 piko detik hingga suhu mencapai 1 K. Hasil *position*, *velocity* dan *acceleration* disimpan setiap 0,5 piko detik. Parameter yang lainnya dilakukan sesuai dengan *default* MOE-*dynamics*.

#### 3.2.9.2 Simulasi Dinamika Molekul pada temperatur 312 K

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada enzim dan kompleks ligan-enzim dengan suhu 312 K dan waktu simulasi selama 5000 piko detik. Ligan yang dimaksud adalah ligan peptida terbaik dan ligan pembanding. Tahapan selanjutnya dilakukan *cooling* selama 20 piko detik hingga suhu mencapai 1 K. Hasil *position*, *velocity* dan *acceleration* disimpan setiap 0,5 piko detik. Parameter yang lainnya dilakukan sesuai dengan *default* MOE-*dynamics*.

### **3.2.10 Analisis Simulasi Dinamika Molekul**

#### **3.2.10.1 Interaksi Enzim-Ligan**

Interaksi kompleks enzim-ligan selama proses *simulasi dinamika molekul* dapat dilihat pada *output database viewer* MOE dalam format.mdb. Selanjutnya dilakukan analisa terhadap ikatan hidrogen, dan kontak residu. Pengamatan kontak residu serta ikatan hidrogen melalui *LigX Ligand Interaction* pada program MOE.

#### **3.2.10.2 Konformasi Enzim-Ligan**

Visualisasi pergeseran posisi konformasi ligan dan pergerakan dinamis konformasi enzim-ligan dan enzim tanpa ligan hasil simulasi dinamika molekul dilakukan dengan memilih konformasi ligan pada beberapa jangka waktu tertentu hingga akhir waktu simulasi. Pada tahapan inisialisasi diambil pengamatan tiap 20 piko detik, tahapan *heating* tiap 10 piko detik, tahapan ekuilibrasi setiap 1000 piko detik dan tahapan *cooling* setiap 10 piko detik. Visualisasi dilakukan pada *software* MOE 2008.10 dalam format .moe.

#### **3.2.10.3 RSMD ( Root Mean Square Deviation)**

Penentuan nilai RMSD dari hasil *trajectory* simulasi dinamika molekul dilakukan dengan menggunakan *software* MOE 2008.10. Perhitungan nilai RMSD dilakukan dengan menggunakan program *conformational geometry* yang terdapat pada MOE *database viewer (dv)*. *File output* hasil perhitungan RMSD dalam format .mdb. Analisis nilai RMSD terhadap perubahan waktu simulasi dapat dilakukan dengan membuat kurva yang terdapat MOE *database viewer (dv)*.

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Pencarian sekuen data neuraminidase Virus Influenza A (H1N1)**

Sekuen data neuraminidase(NA) yang digunakan sebagai target enzim ditentukan dengan menggunakan *database* influenza yang terdapat dalam situs resmi NCBI. Pencarian sekuen data menggunakan parameter yang sama seperti yang dilakukan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Amri tahun 2010, salah satu parameter yang digunakan adalah pemilihan sekuen NA dibatasi antara tahun 2009-2010 . Idealnya pemilihan sekuen yang digunakan sebagai target enzim dilakukan dengan *multiple alignment*, yakni pensejajaran antara sekuens yang sesuai dengan parameter yang diinginkan dengan tujuan mencari satu sekuen yang mewakili seluruh sekuen NA yang ada pada tahun 2009-2010. Namun penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian lanjutan, sehingga harus menggunakan data sekuen yang sama dengan penelitian sebelumnya dan tidak perlu dilakukan *multiple alignment*. Sekuen NA yang digunakan adalah sekuen neuraminidase dari Auckland tahun 2009, *Neuraminidase [A/Auckland/1/2009(H1N1)]* dengan kode *genbank ACR08499.1*.

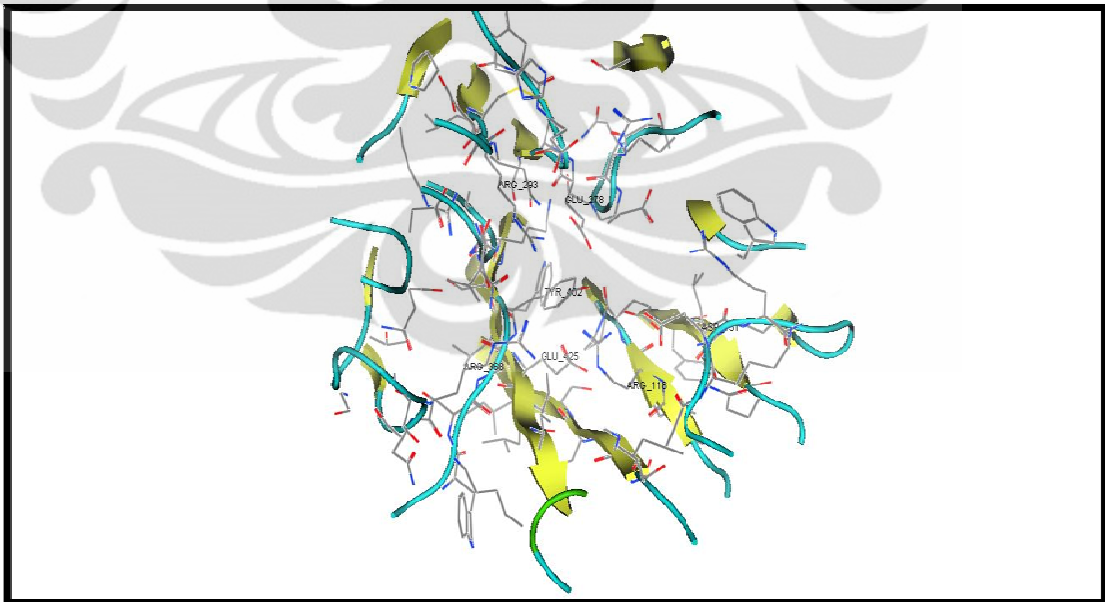
#### **4.2 Homology modeling Neuraminidase Virus Influenza (H1N1)**

Pencarian struktur tiga dimensi *Homology Modeling* dilakukan dengan menggunakan *software online* Swiss-Model (Swiss Institute of Bioinformatics & the Biozentrum University of Basel). Sekuen neuraminidase yang telah ditentukan sebelumnya di-*download* dengan format file FASTA, dan kemudian di *upload* ke *software online* tersebut. Swiss-Model akan mendesain struktur 3D dari sekuen neuraminidase yang telah ditentukan dengan memodelkannya berdasarkan template (struktur pembanding) dari database neuraminidase yang terdapat di situs resmi PDB (Protein Data Bank). Hasil dari pembuatan ini berupa file struktur 3D neuraminidase dengan format .pdb. Kondisi yang harus diperhatikan dari hasil struktur 3D yang diperoleh adalah nilai persentase identitas (% identity) minimal harus 60% antara

struktur yang dihasilkan dengan template yang digunakan sebagai pembanding. Pada penelitian ini struktur 3D neuraminidase yang dihasilkan memiliki persentase identitas sebesar 99,479% berdasarkan template yang digunakan (3nssB dari PDB). Nilai persentase identitas yang besar ini menunjukkan bahwa struktur 3D neuraminidase ini baik untuk digunakan pada tahapan penelitian sebelumnya.

#### 4.3 Visualisasi Sisi Katalitik Neuraminidase Influenza A (H1N1)

Penentuan sisi katalitik neuraminidase dilakukan berdasarkan studi terhadap sekuen virus. Data terkait sisi katalitik tersebut telah tersedia pada hasil pencarian sekuen dari NCBI. Dari hasil tersebut diketahui bahwa neuraminidase yang digunakan memiliki sisi katalitik yang terdiri atas tujuh asam amino fungsional, yaitu Arg118, Asp151, Glu278, Arg293, Arg368, Tyr402 dan Glu425. Ketujuh residu terdiri atas empat residu asam amino yaitu Arg, Asp, Glu dan Tyr, yang memiliki sifat polar dan bermuatan positif serta negatif. Dari hasil visualisasi terlihat bahwa residu sisi katalitik terletak di permukaan enzim dan membentuk rongga yang luas.



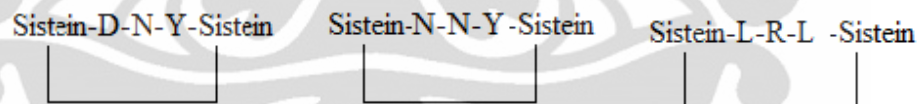
**Gambar 4.1. Visualisasi Sisi Katalitik neuraminidase Influenza A ( H1N1)**

Dengan program map pada software MOE 2008.10 juga dapat diketahui daerah pengikatan (*binding site*) dari neuraminidase. *Binding site* neuraminidase ada

disekitar Glu 119, Arg 152, Arg 156, Trp 179, Ser 180, Ile 223, Arg 225, Glu 228, Ser 247, Tyr 274, Glu 277, dan Asn 295. Residu- residu asam amino pada binding site ini cenderung bermuatan positif dan polar, sehingga lebih menyukai residu substrat yang memiliki gugus bermuatan negatif.

#### 4.4 Perancangan Struktur Tiga Dimensi Ligan Peptida

Perancangan sekuen asam amino peptida dilakukan dengan menggunakan *software ACD/Chemsketch*. Rancangan peptida yang kemudian disebut ligan merupakan peptida siklis disulfida yang dihaikan dari penelitian sebelumnya, yaitu ligan DNY, NNY, dan LRL (Amri, 2010). Selain ketiga ligan tersebut dirancang pula ligan zanamivir dan oseltamivir yang berperan sebagai ligan standar, dan pada tahap ini diperlakukan sama seperti ligan peptida. Ligan zanamivir dan oseltamivir merupakan ligan hasil sintesis yang telah umum digunakan sebagai inhibitor neuraminidase. Struktur dua dimensi dari ligan standar yang digunakan dapat dilihat pada **Lampiran 4**. Ligan DNY, NNY dan LRL merupakan ligan dengan bentuk pentapeptida siklis disulfida yang terdiri dari dua asam amino sistein dengan ikatan disulfida, dan tiga asam amino lainnya.



Bentuk siklisasi dengan asam amino sistein dan ikatan disulfida bertujuan untuk meningkatkan kestabilan molekul peptida apabila dimasukkan ke dalam tubuh, sehingga tidak mudah terpotong oleh protease. Huruf-huruf tersebut mewakili residu asam amino, seperti yang terdapat pada **Lampiran 2**.

Pada studi perancangan inhibitor peptida, pemilihan asam amino DNY, NNY, dan LRL berdasarkan kesamaan sifat gugus (*structure based design*), serta entri blocker (*entry blocker design*) terhadap neuraminidase dengan pendekatan simulasi *molecular docking*. Dengan menggunakan *software ACDlabs* dimodelkan peptida dalam bentuk zwitter ion karena dalam darah dan jaringan lain dalam tubuh serta

pada pH fisiologis, gugus karboksilat akan terdeprotonasi membentuk  $R\text{-COO}^-$  sedangkan gugus aminonya akan terprotonasi membentuk  $\text{-NH}_3^+$  (Murray et al, 2003).

Pemodelan dengan *zwitter ion* juga bertujuan agar gugus-gugus peptida dapat berinteraksi dengan residu asam amino dari enzim yang terdeprotonasi. Kemudian dilakukan optimasi struktur 3D dari ligan yang telah dirancang (3D optimization). Format penyimpanan rancangan ligan adalah dalam bentuk *MDL Molfile*. Namun format penyimpanan ini tidak dapat dibaca oleh software MOE 2008.10 untuk simulasi lanjutan (*molecular docking&dynamics simulation*), sehingga dilakukan perubahan format penyimpanan menjadi *MDL Mol* dengan bantuan software Vegazz.

#### 4.5 Preparasi File *Molecular Docking*

##### 4.5.1 Optimasi Geometri dan Minimasi Neuraminidase

Proses optimasi neuraminidase perlu dilakukan sebelum simulasi *molecular docking* dengan tujuan enzim berada dalam kondisi paling optimum ketika simulasi dilakukan. Langkah pertama proses optimasi dilakukan dengan program *protonate 3D* pada software MOE 2008.10, hal ini bertujuan agar enzim berubah menjadi dalam keadaan terprotonasi. Aplikasi *protonate 3D* ini akan mengubah enzim menjadi dalam keadaan tingkat ionisasinya dan menampilkan posisi atom hidrogen pada struktur kristal. Atom hidrogen ini diperlukan dalam proses *molecular mechanics, dynamics*, ataupun dalam perhitungan interaksi elektrostatik. Kemudian dilakukan penambahan muatan (partial charge) dengan menggunakan parameter *method current force field*. Penambahan muatan parsial bertujuan untuk memastikan bahwa muatan enzim yang terprotonasi tepat dengan keadaan alaminya, sehingga proses *docking* akan berlangsung sesuai dengan keadaan nyata. Perlakuan *hidrogen fix* digunakan untuk memperbaiki struktur molekul apabila terdapat atom hidrogen yang berubah posisi atau hilang.

Proses selanjutnya adalah minimisasi energi enzim dengan program *energy minimize* pada software MOE 2008.10. Hal ini bertujuan untuk menghindari kontak

van der Waals yang tidak disesuaikan (*bad contact*) dan untuk meminimalkan efek-efek sterik berenergi tinggi dari struktur (Nurbaiti, 2009). Pengaturan parameter minimisasi energi dilakukan pada *potential setup*, dengan parameter yang digunakan *forcefield* MMFF94x, jenis solvasi yang digunakan adalah *gas phase* karena pada saat *docking* perlu dihilangkan energi solvasinya, dan RMS *gradient* 0.05 kkal/mol Å (Singh *et al.*, 2007). Penggunaan MMFF94x sebagai *forcefield* dinilai lebih baik dibandingkan *forcefield* yang lain karena kepekaannya terhadap optimasi geometri protein (enzim) yang cukup tinggi (Halgren, 1999). *Forcefield* MMFF94x juga dapat menempatkan atom hidrogen pada posisi yang paling tepat sehingga sangat berguna juga untuk validasi posisi atom hidrogen dalam keadaan solvasi oleh molekul air. Parameter lainnya menggunakan *default* dan *file output* dalam format *.moe*.

#### 4.5.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Struktur 3 Dimensi Peptida Siklis

Ligan-ligan peptida dan standar (oseltamivir&zanamivir) yang telah berada dalam format *MDL Mol* diimport ke dalam *database viewer (dv) MOE 2008.10* untuk dilakukan proses optimasi dan minimisasi. Langkah pertama yang dilakukan adalah *wash* untuk seluruh ligan dengan tujuan untuk memperbaiki posisi atom hidrogen yang terdapat pada ligan dan memperbaiki struktur ligan. Setelah itu dilakukan *partial charge*, dengan parameter *method* yang digunakan adalah MMFF94 yang dapat digunakan dalam validasi posisi dari atom hidrogen pada ligan. Umumnya, MMFF94 dapat digunakan untuk molekul kecil seperti peptida. Proses minimisasi energi kemudian dilakukan dengan RMS *gradient* 0.001 kkal/mol Å (Singh *et al.*, 2007).

#### 4.6 Molecular Docking

Molecular *docking* dirancang untuk mencari konformasi ikatan yang tepat antara ligan dan reseptor. Pada penelitian sebelumnya proses *docking* dilakukan sebagai screening dari sejumlah kandidat ligan sehingga diperoleh ligan terbaik yang terikat secara geometri dan energisitas dengan binding site protein (Teodoro *et al.*,

2001). Kemudian dilakukan analisis interaksi dan *drug scan* pada kandidat ligan terbaik sehingga diperoleh ligan yang potensial untuk dikembangkan sebagai obat seperti ligan DNY, NNY, dan LRL (Amri, 2010)

Pada penelitian ini, proses *docking* dilakukan sebelum simulasi dinamika molekul dengan tujuan agar ligan dan enzim berada dalam konformasi yang optimal (Fadhilah, 2010). Molecular *docking* menggunakan program *dock* yang terdapat pada software MOE 2008.10. Proses *docking* dilakukan pada tiga ligan peptida potensial (DNY, NNY, LRL) serta standar zanamivir dan oseltamivir terhadap sisi katalitik neuraminidase yaitu Arg118, Asp151, Glu278, Arg293, Arg368, Tyr402 dan Glu425. Pemilihan ketujuh residu sisi aktif menggunakan *sequence editor* yang terdapat pada MOE 2008.10 sehingga proses *docking* diharapkan spesifik terhadap ketujuh residu asam amino fungsional tersebut. Pada proses *docking* enzim berada dalam kondisi yang rigid sedangkan ligan berada dalam kondisi yang fleksibel sehingga dapat bebas bergerak dan berotasi.

Parameter yang diatur pada proses *docking* antara lain, *placement method* yang digunakan adalah *Triangle Matcher* yang merupakan default dari program MOE-*dock* dengan banyaknya jumlah putaran 1000 (Feher *et al.*, 2009). *Triangle Matcher* digunakan untuk mengorientasikan ligan dalam sisi aktif berdasarkan pada *charge group* dan *spatial fit*. *Triangle Matcher* menunjukkan gerakan acak ligan dalam sisi aktif enzim untuk menghasilkan orientasi ikatan yang optimal (Wilmand *et al.*, 2003).

Fungsi *scoring* yang digunakan adalah London dG dengan *retain* (tampilan) sebesar 100, tanpa duplikasi (Mazur *et al.*, 2009). London dG menunjukkan besarnya energi bebas Gibbs ikatan ( $\Delta G_{\text{binding}}$ ) dari tiap posisi antara ligan dengan enzim yang dihasilkan dengan persamaan:

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

dimana  $c$  = rerata entropy rotasi dan translasi yang didapat atau dilepaskan,  $E_{\text{flex}}$  = energi yang menyatakan berkurangnya fleksibilitas dari ligan,  $f_{\text{HB}}$  = ukuran ketidaksempurnaan geometri dari ikatan hidrogen,  $c_{\text{HB}}$  = energi dari ikatan hidrogen



ideal,  $f_M$  = ukuran ketidaksempurnaan geometri dari *metal ligations*,  $c_M$  = energi dari *ideal metal ligation*, dan  $D_i$  = energi desolvasi atom ke-i (MOE tutorial, 2008).

Selanjutnya hasil *pose* ligan setelah tahap penempatan dapat diperbaiki lebih lanjut pada tahap *refinement* (perbaikan). *Refinement* yang digunakan adalah *forcefield* dengan konfigurasi sesuai default. Konfigurasi diatur dengan ukuran pengulangan populasi sebanyak 1000. Pengaturan *default* dari *refinement forcefield* menggunakan *pocket cut off* 6Å, yaitu jarak reseptor yang diikutsertakan pada proses *docking* (Feher *et al.*, 2009). Retain terakhir diatur hanya menampilkan satu konformasi yang paling sesuai dan terbaik.

#### 4.7 Analisis Molecular Docking

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

##### 4.7.1 Energi Bebas Ikatan ( $\Delta G_{binding}$ )

Nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G_{binding}$ ) terkuantifikasi oleh konstanta aktivitas biologis  $K_A$  dengan asumsi di dalam kondisi termodinamika yang setimbang dalam bentuk formasi kompleks protein-ligan [EI]. Nilai  $\Delta G_{binding}$  menggambarkan kuat ikatan yang terjadi antara enzim dengan ligan. Terdapat hubungan antara nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G_{binding}$ ) dengan konstanta inhibitor ( $K_i$ ) yang nilainya mengikuti persamaan termodinamik berikut (Kitchen *et al.*, 2004).

$$\Delta G^0 = - RT \ln K_A \qquad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Berdasarkan pada persamaan diatas, semakin negatif dari harga  $\Delta G_{binding}$  maka ikatan kompleks enzim-ligan akan semakin kuat. Hal ini karena kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada kompleks enzim-ligan dapat dilihat dari

besarnya energi bebas yang dilepaskan saat interaksi pada kompleks enzim-ligan terbentuk.

Berdasarkan hasil simulasi *docking* dihasilkan bahwa ligan DNY memiliki nilai  $\Delta G_{binding}$  yang paling negatif dan menunjukkan bahwa ligan DNY memiliki ikatan yang paling kuat terhadap enzim dibandingkan dengan dua enzim peptida lainnya (NNY dan LRL) serta standar. Berikut data energi hasil simulasi *docking*.

**Tabel 4.1. Data  $\Delta G_{binding}$  hasil simulasi *docking***

Ligan	$\Delta G_{binding}$ (Kcal / mol)	PKi
DNY	- 7, 8544	18, 094
NNY	- 6,8994	14, 977
LRL	- 6,8056	12, 867
Zanamivir	- 6,5858	12, 568
Oseltamivir	-4, 1582	9,894

Ketiga ligan peptida yang telah didesain sebagai calon obat memiliki nilai energi bebas ikatan yang lebih negatif dibandingkan dengan standar (oseltamivir dan zanamivir). Kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada kompleks enzim-ligan dapat dilihat dari besarnya energi bebas yang dilepaskan saat interaksi pada kompleks enzim-ligan yang terbentuk. Data  $\Delta G_{binding}$  yang negatif dan relatif kecil menandakan bahwa konformasi ligan yang terbentuk pada kompleks enzim-ligan pada konformasi yang paling stabil. Sehingga dapat dianalisa bahwa ketiga ligan peptida membentuk kompleks enzim-ligan pada konformasi yang lebih stabil dibandingkan ligan standar (Zanamivir dan Oseltamivir), dan mampu menghambat enzim lebih baik dibandingkan standar.

#### 4.7.2 Ikatan Hidrogen

Analisa proses *docking* tidak hanya dilihat dari nilai  $\Delta G_{binding}$ , tetapi juga dari interaksi antara ligan dengan enzim melalui kontak residu khususnya ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen didefinisikan sebagai gaya intermolekul atau intramolekul yang

terjadi antara atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi dengan atom hidrogen yang terikat secara kovalen pada suatu atom elektronegatif (Nurbaiti, 2009). Ikatan hidrogen yang terjadi pada kompleks enzim-ligan dapat diidentifikasi dan dianalisis dalam program *ligand interaction* dengan menggunakan *software* MOE 2008.10.

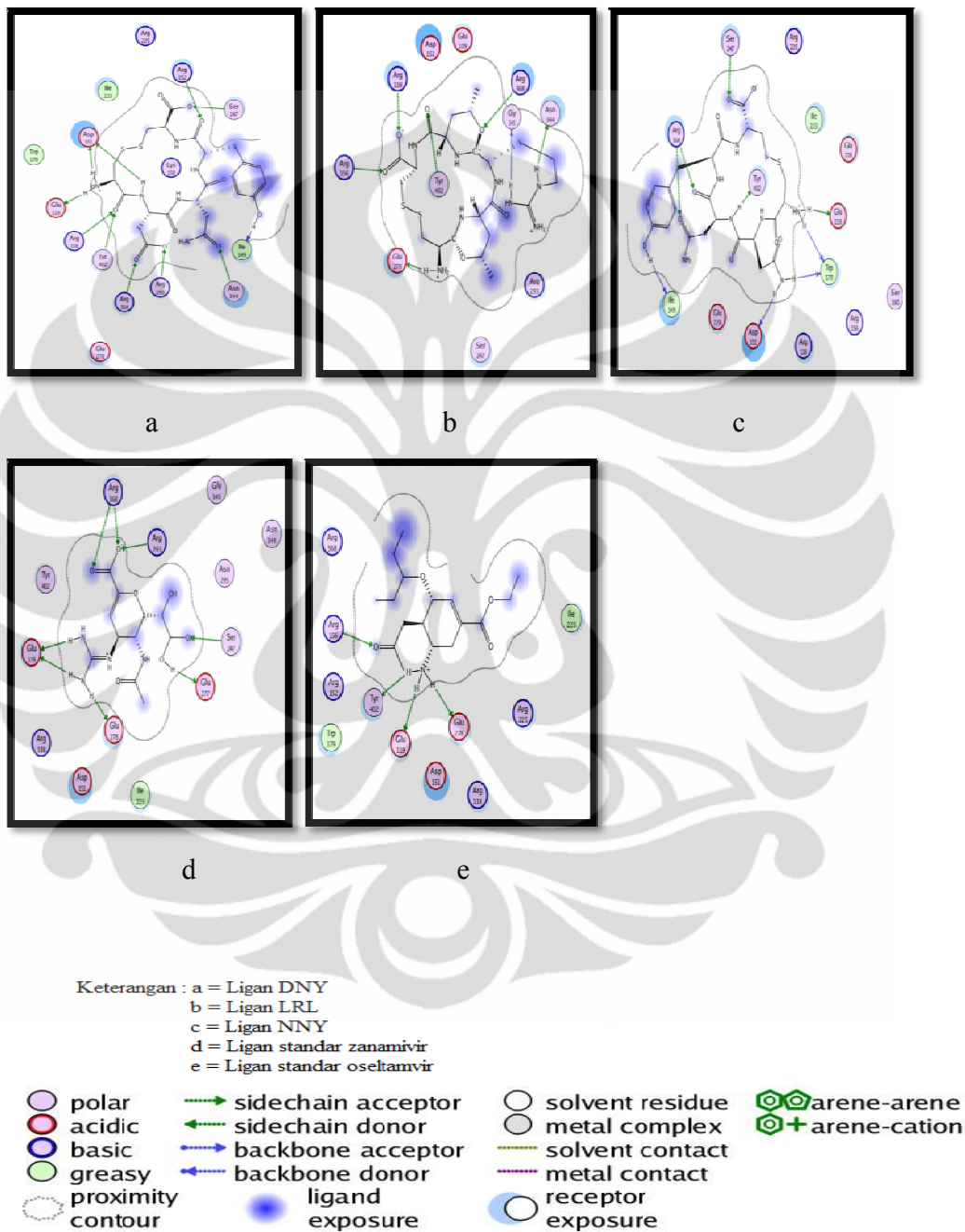
**Tabel 4.2. Residu asam amino neuraminidase yang membentuk ikatan hidrogen dengan ligan**

Ligan	Ikatan Hidrogen dengan Neuraminidase
DNY	Glu119, Ile 149, Asp 151, Asp 151, Arg 118, Arg 152, Arg 152, Ser 247, Arg 293, Asn 344, Arg 368, Arg 368, Tyr 402
LRL	Glu 278, Asn 344, Gly 345, Arg118, Arg 156, Arg 368, Tyr 402
NNY	Ile149, Asp 151, Trp 179, Trp 179, Glu 228, Tyr 402, Ser 247, Arg 368, Arg 368
Zanamivir (standar)	Glu 119, Glu 119, Ser 247, Glu 277, Glu 278, Ser 247, Arg 293, Arg 368, Arg 368
Oseltamivir (standar)	Glu 119, Glu 278, Tyr 402, Arg 156

Ket : Huruf cetak merah merupakan residu sisi katalitik neuraminidase

Berdasarkan table data hasil docking, ligan DNY, LRL, dan NNY memiliki 13, 7, dan 9 ikatan hidrogen dengan residu asam amino. Dengan ligan DNY membentuk ikatan hidrogen dengan 6 residu katalitik enzim, LRL membentuk ikatan hidrogen dengan 4 residu katalitik enzim, dan NNY membentuk ikatan hidrogen dengan 4 residu katalitik enzim. Sedangkan ligan standar zanamivir membentuk 9 ikatan hidrogen dengan residu asam amino, dan oseltamivir membentuk 4 ikatan hidrogen dengan residu asam amino. Ikatan hidrogen yang terbentuk oleh ligan standar cenderung lebih sedikit dibandingkan ligan peptida, dengan zanamivir membentuk ikatan hidrogen dengan 4 residu katalitik enzim, dan oseltamivir membentuk ikatan hidrogen dengan 2 residu katalitik enzim. Sehingga dapat dianalisa bahwa ligan peptida memiliki interaksi dengan enzim lebih baik dibandingkan standar, dan memiliki kemampuan inhibisi yang lebih baik dibandingkan standar.

Berikut ini adalah gambar ikatan hidrogen antara ligan dan residu asam amino enzim.



Gambar 4.2. Interaksi ligan hasil docking

Interaksi yang terjadi pada hasil docking dengan keadaan enzim rigid, kemudian dievaluasi dengan keadaan molekul terhidrasi menggunakan metode simulasi dinamika molekul.

#### 4.8 Simulasi Dinamika Molekul (*Molecular Dynamics Simulation*)

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada kompleks enzim-ligan hasil docking, serta pada enzim bebas. Tujuannya untuk mengamati kestabilan konformasi enzim kemudian membandingkannya dengan konformasi kompleks enzim-ligan. Pada simulasi ini, ligan dan enzim akan berada dalam keadaan yang fleksibel, serta dapat dipelajari pengaruh adanya pelarut dalam sistem kemudian diaplikasikan untuk mengeksplorasi konformasi dari reseptor protein untuk meningkatkan proses perancangan obat (Alonso *et al.*, 2006).

Proses simulasi dinamika molekul terhadap tiga ligan peptida siklis dan ligan standar (zanamivir & oseltamivir) dilakukan dengan menggunakan program *MOE-dynamics* pada *software MOE 2008.10*. Sebelum simulasi dimulai, perlu dilakukan tahap preparasi terhadap enzim-ligan. Sebelumnya kompleks enzim-ligan yang akan digunakan dilakukan optimasi *partial charges* dan minimisasi terlebih dahulu dengan *forcefield* MMFF94x. *Force field* MMFF94x dapat menempatkan atom hidrogen pada posisi yang paling tepat sehingga sangat berguna juga untuk validasi posisi atom hidrogen dalam keadaan solvasi oleh molekul air (Panigrahi & Desiraju, 2007). Selain itu *force field* tersebut mengungguli *force field* yang lain dalam hal optimasi energi (Abhishek & Sunil, 2007).

Berbeda dengan simulasi *molecular docking* yang menggunakan solvasi *gas phase*, simulasi *molecular dynamics* menggunakan solvasi *born*. Jenis solvasi ini merupakan sistem solvasi implisit, yaitu molekul pelarut hanya berperan sebagai medium dan tidak terlalu terlibat dalam proses simulasi (Nurbaiti, 2009). Sedangkan sistem solvasi eksplisit, molekul protein secara nyata dikelilingi oleh pelarut. Adanya jenis solvasi *born*, mengakibatkan energi solvasi (*Esol*) ikut diperhitungkan dalam energi potensial sistem molecular yang merupakan fungsi dari koordinat atom:

$$E(x) = E_{\text{str}} + E_{\text{ang}} + E_{\text{stb}} + E_{\text{oop}} + E_{\text{tor}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{sol}} + E_{\text{res}}$$

dimana  $E_{\text{str}}$  = energi *stretching*,  $E_{\text{ang}}$  = energi *angular*,  $E_{\text{stb}}$  = energi *stretching* dan *bending*,  $E_{\text{oop}}$  = energi operasi,  $E_{\text{tor}}$  = energi bebas torsional,  $E_{\text{vdw}}$  = energi *intermolecular* vdw,  $E_{\text{ele}}$  = energi elektrostatik,  $E_{\text{sol}}$  = energi solvasi pelarut, dan  $E_{\text{res}}$  = energi tiap residu yang bergerak. Terlihat jelas bahwa dalam persamaan tersebut terdapat nilai  $E_{\text{sol}}$ . Sedangkan dalam proses *molecular docking* persamaan tersebut berlaku, namun tidak mengikutsertakan  $E_{\text{sol}}$ .

Parameter yang digunakan sesuai dengan *default* pada *MOE-dynamics*, yaitu *ensemble* NVT (N: jumlah atom; V: volume; T: temperatur) dengan algoritma Nose-Poincare-Anderson (NPA). Penggunaan *ensemble* NVT atau yang disebut dengan *ensemble* kanonikal karena dalam tingkat makroskopis ataupun laboratorium, temperatur sistem lebih mudah dikendalikan daripada energi total sistem (E), maka simulasi dilakukan pada temperatur konstan. Algoritma NPA yang digunakan, merupakan algoritma yang paling akurat dan sensitif serta dapat mengatur *ensemble* secara benar dan dapat memastikan bahwa *trajectory* yang dihasilkan yang sesuai dengan kondisi termodinamik yang diinginkan. Sedangkan tekanan yang digunakan 101 kPa. Hasil *position*, *velocity*, dan *acceleration* disimpan setiap 0.5 ps. Nilai *pocket cutoff* yang digunakan pada simulasi *molecular dynamics* adalah sebesar 6Å, yaitu jarak reseptor yang diikutsertakan pada proses *molecular dynamics*.

Setelah semua parameter tersebut diatur dalam potensial set up software MOE 2008.10, dilakukan optimasi dan minimisasi energi kompleks enzim-ligan. Koordinat awal suatu biomolekul umumnya diperoleh dari hasil kristalografi sinar X atau pemodelan struktur 3D, yang jarak antar satu dengan lainnya sangat dekat ataupun sangat jauh dari posisi kesetimbangan. Adanya ketidaksesuaian geometri tersebut menyebabkan terjadinya interaksi yang tidak disukai (*bad contact*) maupun efek-efek sterik berenergi tinggi yang dapat mengakibatkan sistem yang disimulasikan menjadi tidak stabil. Maka setelah parameter simulasi disesuaikan sehingga mendekati keadaan nyata, dilakukan proses minimisasi sehingga posisi geometri atom yang tidak sesuai dapat dikembalikan sehingga dihasilkan energi potensial terendah bagi sistem (Nurbaiti, 2009). Penentuan sistem unit, algoritma dan parameter simulasi tersebut merupakan bagian dari tahapan inisialisasi.

Tahapan inisialisasi selanjutnya adalah inisialisasi molekul-molekul yaitu melakukan *run* selama 30 dan 35 ps. Tahapan inisialisasi merupakan suatu tahapan persiapan pelarut sebelum memasuki tahapan selanjutnya dalam proses simulasi dinamika molekul. Inisialisasi molekul melibatkan penentuan posisi awal dan kecepatan awal molekul-molekul. Selain itu tahapan inisialisasi juga mengatur sistem untuk memiliki energi relative minimum dan mengendurkan interaksi berenergi tinggi sebelum masuk ke tahap selanjutnya.

#### 4.8.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 300 K

Hasil inisialisasi dilanjutkan dengan simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K. Pengaturan waktu dilakukan pada *dynamicss box* kolom *run* selama 5000 ps. Kolom *run* merupakan kolom untuk tahap ekuilibrasi. Kemudian dilakukan *cooling stage* selama 20 ps. Temperatur yang digunakan adalah 300 K. Temperatur tersebut merupakan temperatur kamar yang biasanya digunakan untuk melakukan simulasi *molecular dynamics* (Zuo et al., 2009; Wichapong et al., 2009). Setelah sistem melalui tahap ekuilibrasi, sistem akan didinginkan (*cooling stage*) dengan tujuan untuk menemukan energi konformasi terendah dari molekul. Proses tersebut dikenal sebagai *annealing*. *Cooling stage* membuat temperatur simulasi mencapai 1 K. Hasil *position*, *velocity* dan *acceleration* disimpan setiap 0,5 ps. *Output* hasil simulasi berupa *database* dengan format *.mdb*.

#### 4.8.2 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 312 K

Simulasi dinamika molekul juga dilakukan pada temperatur 312 K. Temperatur ini dipilih karena merupakan temperatur tubuh manusia saat mengalami demam akibat infeksi virus H1N1. Sehingga dapat diketahui interaksi antara ligan dengan enzim saat tubuh manusia mengalami demam. Hasil inisialisasi dengan parameter, yang sama seperti yang dilakukan pada simulasi dinamika molekul dilakukan pada temperatur 300 K, dilanjutkan untuk simulasi pada temperatur 312 K. Hal yang berbeda pada, yaitu pada proses *heating stage* dari temperatur 300 K hingga temperatur 312 K selama 20 ps. *Heating stage* tersebut merupakan kondisi yang

digunakan saat menaikkan temperatur sistem kemudian sistem menuju ke *equilibrium stage*. Kemudian kolom *run* yang merupakan tahap ekuilibrasi dilakukan selama 5000 ps. Ekuilibrasi tersebut merupakan proses pemerataan kerapatan posisi atom di semua bagian sistem sekaligus memberikan kondisi rileks pada molekul akibat pengekangan ketika sistem dipanaskan (Nurbaiti, 2009).

Hasil berupa *position*, *velocity* dan *acceleration* disimpan setiap 0,5 ps. Tahapan produksi mengindikasikan suatu tahapan yang dapat menghasilkan *trajectory* dari suatu simulasi. *Trajectory* yang diperoleh merupakan koordinat yang dibentuk dengan merekam perubahan-perubahan struktural dari waktu ke waktu kemudian menunjukkan posisi setiap atom sepanjang serangkaian langkah waktu (Sharma *et al.*, 2009). *Trajectory* memvisualisasikan konformasi molekul yang terjadi selama serangkaian waktu simulasi dinamika molekul kemudian dianalisis interaksi yang terjadi antara ligan terhadap enzim.

#### 4.9 Analisis Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada skala waktu nano detik karena pada skala waktu tersebut dapat diamati pergerakan tulang punggung yang relatif kaku (*rigid body motion*) yang meliputi pergerakan untaian  $\alpha$ -*helix* dan pergerakan domain enzim (Nurbaiti, 2009). Untuk menganalisis dan membandingkan perilaku dinamis ligan terhadap sisi aktif neuraminidase selama simulasi dinamika molekul, dilakukan pengamatan interaksi ligan dengan residu enzim selama periode simulasi hingga akhir simulasi. Interaksi ligan yang diamati meliputi kontak residu dan ikatan hidrogen (*direct interaction*). Analisis terhadap kontak residu perlu dilakukan untuk mengetahui jenis residu asam amino dari enzim yang berinteraksi dengan ligan karena adanya interaksi non-kovalen yang terjadi antara enzim dan ligan maka dapat meningkatkan afinitas ligan terhadap enzim. Dilakukan pula perbandingan kontak residu hasil *docking* dan akhir simulasi. Selain itu dilakukan analisis kuantitatif RMSD (*root mean square deviation*) untuk penentuan stabilitas konformasi kompleks enzim dan ligan.



Pengamatan perilaku dinamis enzim dan kompleks enzim-ligan dalam keadaan terhidrasi dilakukan dengan mengamati konformasinya dalam beberapa *frame*. *Frame* konformasi saat inialisasi sejumlah 3 *frame* setiap 15 ps, tahap heating sejumlah 3 *frame*, tahap cooling 3 *frame* setiap 10 ps. Sedangkan simulasi utama pada temperatur 300 K dan 312 K masing-masing sebanyak 6 *frame*. Jumlah *frame* untuk temperatur 300 K pada tiap ligan adalah 12 *frame*, dan temperatur 312 K adalah 15 *frame* karena menyertakan tahap *heating*.

#### 4.9.1 Analisis Interaksi Enzim-Ligan

##### 4.9.1.1 Simulasi Dinamika Molekul pada Temperatur 300 K

Simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K menunjukkan bahwa terjadi beberapa perubahan kontak residu dan ikatan hidrogen pada ketiga ligan peptida dan standar selama simulasi berlangsung. Pada **Tabel 4.3** memperlihatkan data interaksi ligan selama simulasi.

**Tabel 4.3. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 300 K**

Waktu	Ligan DNY	Ligan LRL	Ligan NNY	Zanamivir	Oseltamivir
Setelah inialisasi	Arg 293, Arg 368	Glu 119, Tyr 402, Arg 118, Arg 152, Arg 156,	Asp 151, Asp 151, Asp 151, Glu 228, Arg 118, Tyr 402	Glu 119, Glu 119, Asp 151, Arg 293, Arg 293, Arg 368, Arg 368	Glu 119
500 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 152, Arg 225, Arg 368, Arg 368, Lys 432	Glu 119, Glu 228, Arg 152, Arg 156, Arg 293	Asp 151, Glu 228, Ile 427, Arg 152,	Glu 119, Glu 119, Glu 278	Glu 119, Asp 151,
1000 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 225, Arg 225, Arg 225, Arg 368,	Glu 119, Arg 156	Asp 151, Ser 180, Glu 228, Arg 152, Arg 225	Ser 180, Leu 224, Arg 152, Arg 293	Glu 228, Arg 293, Glu 278

Tabel 4.3. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 300 K (lanjutan)

1500 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 152, Arg 225, Arg 225, Lys 347, Arg 368, Lys 432	Glu 119, Arg 118, Arg 156	Asp 151, Glu 228, Arg 225, Arg 225, Lys 347	Glu 278, Arg 152, Arg 293, Arg 293	Glu 278, Glu 228,
2000 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 152, Arg 225, Arg 368, Lys 432	Glu 119, Glu 119, Glu 119, Ser 145, Glu 228	Asp 151, Glu 228, Glu 425, Arg 152, Arg 293, Lys 347	Glu 119, Glu 119, Asp 151, Arg 225, Arg 293	Glu 278, Glu 228,
2500 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 225, Arg 225, Lys 347, Arg 368, Arg 368	Glu 119, Gln 136, Gln 136, Arg 156	Glu 228, Glu 425, Arg 152, Arg 293, Lys 347	Glu 119, Asn 344	Glu 278, Glu 228,
3000 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 293, Arg 152, Arg 301, Arg 301, Lys 347	Glu 119, Tyr 402, Lys 150, Tyr 402	Asp 151, Glu 228, Glu 425, Arg 225, Arg 293, Lys 347	Glu 119, Thr 226, Glu 425, Arg 293, Arg 293, Arg 368	Glu 278, Glu 228,
3500 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 293, Arg 225, Arg 225, Arg 225, Arg 301, Arg 301, Lys 347	Glu 119, Leu 139, Glu 228, Tyr 402, Arg 156	Asp 151, Glu 228, Glu 425, Arg 152, Arg 225, Lys 347	Glu 228, Glu 228, Glu 425, Arg 225, Arg 368	Glu 278, Arg 225
4000 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 225, Arg 225, Arg 301, Lys 347	Glu 119, Gly 137, Tyr 402	Asp 151, Glu 228, Glu 425, Arg 293, Arg 293	Glu 228, Arg 293, Arg 368	Glu 228, Glu 278

Tabel 4.3. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 300 K (lanjutan)

4500 piko detik	Asp 151, Arg 152, Arg 225, Arg 301, Arg 301, Asn 344	Glu 119, Glu 228, Tyr 402	Asp 151, Glu 228, Gly 345, Glu 425, Arg 293, Lys 347	Thr 226, Tyr 402, Tyr 402, Arg 293, Arg 368	Glu 228, Glu 278
5000 piko detik	Asp 151, Arg 225, Arg 293, Arg 293, Arg 301, Asn 344	Glu 119, Glu 119, Glu 119, Pro 120, Lys 150	Asp 151, Glu 228, Gly 345, Glu 425, Glu 425, Arg 225, Arg 293, Lys 347	Asp 151, Glu 228, Glu 278, Arg 152, Arg 293	Glu 119, Glu 425
Cooling 20 piko detik (setelah akhir simulasi)	Asp 151, Glu 228, Asn 344, Arg 152, Arg 225, Arg 225, Arg 293, Arg 301, Arg 301	Glu 119, Glu 119, Glu 119, Pro 120, Lys 150, Arg 118, Arg 293	Asp 151, Glu 228, Gly 345, Glu 425, Glu 425, Arg 152, Arg 225, Arg 293, Trp 296, Lys 347	Asp 151, Glu 228, Glu 228, Glu 278, Glu 278, Arg 152, Arg 293, Arg 293, Arg 293	Glu 119,

Ket : Huruf cetak merah merupakan residu sisi katalitik neuraminidase

Pembentukan ikatan hidrogen selama proses simulasi dinamika berlangsung dapat terjadi melalui beberapa cara, diantaranya adalah ikatan antara gugus fungsi ligan dengan rantai samping enzim dan antara gugus fungsi ligan dengan *backbone* enzim.

Berdasarkan tabel interaksi diatas, kita dapat menganalisa bahwa terjadi perubahan interaksi antara ligan dengan enzim selama simulasi berlangsung. Ligan peptida DNY pada tahap inisialisasi hanya membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim yaitu Arg 293 dan Arg 368. Namun diakhir simulasi, ligan peptida DNY justru membentuk lebih banyak ikatan hidrogen dengan residu asam amino pada enzim. Ikatan hidrogen pada akhir simulasi terbentuk pada dua sisi katalitik enzim yaitu Asp 151 dan Arg 293. Selain pada sisi katalitik, ikatan hidrogen juga

terbentuk pada residu-residu asam amino lain pada enzim, termasuk diantaranya pada Glu228, Arg152, dan Arg225 yang merupakan bagian dari binding site neuraminidase. Bertambahnya interaksi ikatan hidrogen selama simulasi berlangsung dapat diamati dari tabel interaksi. Pertambahan ini disebabkan proses simulasi yang mengkondisikan ligan dan enzim dalam kondisi yang dinamis dengan pengaruh pelarut, sehingga memungkinkan lebih banyak interaksi yang terjadi. Selain itu, temperatur simulasi pada 300 K (temperatur ruang) belum memungkinkan terjadinya perubahan konformasi enzim yang signifikan akibat pengaruh kenaikan temperatur.

Dua ligan peptida lainnya, yaitu LRL dan NNY juga mengalami perilaku dinamis yang ditunjukkan dengan perubahan interaksi ikatan hidrogen pada awal simulasi (tahap inisialisasi) hingga akhir simulasi. Ligan LRL diawal simulasi membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Tyr 402, Arg 118. Selama simulasi berlangsung ikatan dengan Tyr 402 tidak stabil, dan menghilang diakhir simulasi. Di akhir simulasi ligan LRL hanya membentuk ikatan hidrogen dengan dua sisi katalitik enzim Arg 118 dan Arg 293. Ligan NNY diawal simulasi membentuk ikatan hidrogen dengan tiga sisi katalitik enzim Asp 151, Arg 118 dan Tyr 402. Berbeda dengan ligan LRL yang hingga akhir simulasi tetap berikatan dengan dua sisi katalitik enzim, ligan NNY diakhir simulasi mengalami penambahan interaksi dengan membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Glu 425 dan Arg 293. Sementara ikatan hidrogen dengan Arg 118 dan Tyr 402 justru menghilang diakhir simulasi.

Perilaku dinamis juga ditunjukkan oleh ligan standar (Zanamivir dan Oseltamivir). Hal ini terlihat dari interaksi pada akhir simulasi, zanamivir mampu membentuk interaksi ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Asp 151, Glu 278, dan Arg 293. Oseltamivir hanya mampu membentuk satu ikatan hidrogen dengan residu asam amino enzim, yaitu pada Glu 119.

Jika dilakukan perbandingan kontak residu antara hasil simulasi docking dengan simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K, maka akan terlihat jelas terjadi perubahan interaksi. Tabel berikut akan menyajikan perbandingan interaksi kedua simulasi

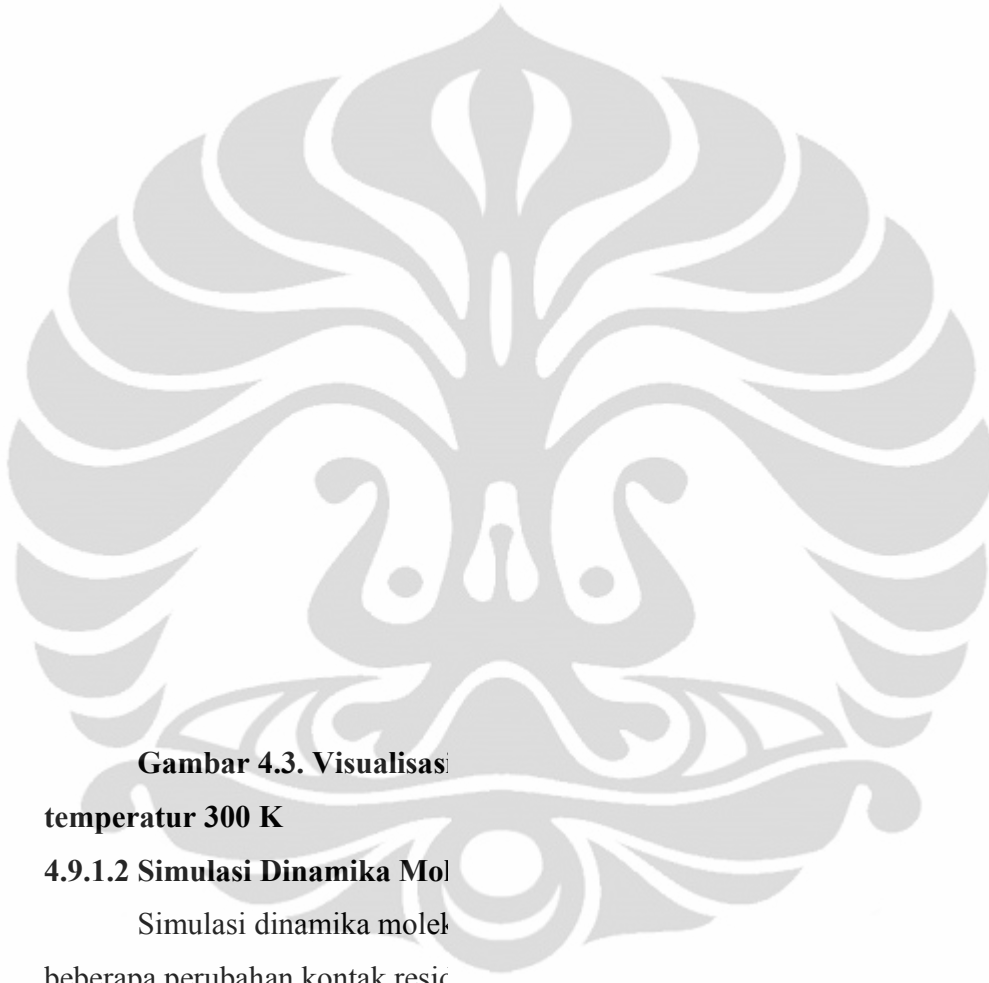
**Tabel 4.4 Perbandingan kontak residu yang terbentuk saat docking dan setelah simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K**

Ligan	<i>Docking</i>	Simulasi dinamika molekul 300 K
DNY	Glu 119, Ile 149, <b>Asp 151, Asp 151, Arg 118</b> , Arg 152, Arg 152, Ser 247, Arg 293, Asn 344, <b>Arg 368, Arg 368, Tyr 402</b>	<b>Asp 151</b> , Glu 228, Asn 344, Arg 152, Arg 225, Arg 225, <b>Arg 293</b> , Arg 301, Arg 301
LRL	<b>Glu 278</b> , Asn 344, Gly 345, <b>Arg 118</b> , Arg 156, <b>Arg 368, Tyr 402</b>	Glu 119, Glu 119, Glu 119, Pro 120, <b>Arg 118</b> , Lys 150, <b>Arg 293</b>
NNY	Ile 149, <b>Asp 151</b> , Trp 179, Trp 179, Glu 228, <b>Tyr 402</b> , Ser 247, <b>Arg 368, Arg 368</b>	<b>Asp 151</b> , Glu 228, Gly 345, <b>Glu 425, Glu 425</b> , Arg 152, Arg 225, <b>Arg 293</b> , Trp 296, Lys 347
Zanamivir	Glu 119, Glu 119, Ser 247, Glu 277, <b>Glu 278</b> , Ser 247, <b>Arg 293, Arg 368, Arg 368</b>	<b>Asp 151</b> , Glu 228, Glu 228, <b>Glu 278, Glu 278</b> , Arg 152, <b>Arg 293, Arg 293, Arg 293</b>
Oseltamivir	Glu 119, <b>Glu 278, Tyr 402</b> , Arg 156	<b>Asp 151</b> , Glu 228, Glu 228, <b>Glu 278, Glu 278</b> , Arg 152, <b>Arg 293, Arg 293, Arg 293</b>

Ket: Huruf cetak merah merupakan residu sisi katalitik neuraminidase

Ketiga ligan peptida (DNY, LRL dan NNY) mengalami penurunan kontak residu selama simulasi dinamik berlangsung. Ligan DNY diawal simulasi mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Asp 151, Arg 118, Arg 368 dan Tyr 402, hanya mampu mempertahankan ikatan hidrogen dengan Asp 151 dan membentuk ikatan baru dengan Arg 293. Sementara ikatan dengan sisi katalitik lainnya yang sudah terbentuk dari hasil *docking* tidak stabil, dan menghilang diakhir simulasi dinamika molekul pada temperatur 300 K. Ligan LRL pada saat *docking* membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Glu 278, Arg 118, dan Tyr 402, diakhir simulasi hanya mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Arg 118 dan Arg 293. Sedangkan ligan NNY pada saat docking membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Asp 151, Arg 368, dan Tyr 402, diakhir simulasi hanya mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Asp

151, Glu 425 dan Arg 293. Visualisasi  
dan akhir simulasi dapat dilihat pada  
interaksi ligan NNY dengan resi



**Gambar 4.3. Visualisasi**  
**temperatur 300 K**

#### **4.9.1.2 Simulasi Dinamika Molek**

Simulasi dinamika molekul  
beberapa perubahan kontak residu  
standar selama simulasi berlangsung  
ligan selama simulasi.

**Tabel 4.5. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 312 K**

Waktu	Ligan DNY	Ligan LRL	Ligan NNY	Zanamivir	Oseltamivir
Setelah inisialisasi	Glu 228, Glu 278, Arg 118, Arg 152, Arg 293	Glu 228, Glu 278, Glu 425, Arg 152, Arg 293, Arg 293	Glu 119, Arg 118, Arg 293, Arg 368, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Asp 151, Ser 180, Ser 180, Arg 293, Tyr 402	Glu 228, Glu 278
Setelah heating (20 piko detik)	Glu 228, Glu 278, Arg 152, Arg 293	Glu 278, Lys 150, Lys 150, Arg 293, Arg 293, Lys 432	Glu 119, Arg 293, Lys 432	Asp 151, Asp 151, Trp 179, Ser 180, Arg 293, Arg 293	Glu 228, Glu 278, Arg 156
500 piko detik	Glu 119, Glu 228, Glu 278, Arg 118, Arg 368, Arg 368	Arg 293, Arg 368, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Arg 225, Arg 293,	Asp 151, Trp 179, Glu 228, Arg 293, Arg 430, Arg 430, Lys 432	Glu 228, Glu 277
1000 piko detik	Glu 119, Glu 228, Glu 228, Arg 118	Asp 151, Asn 344, Arg 225, Arg 293, Arg 368, Arg 368, Arg 428	Asp 151, Arg 152, Arg 152, Arg 293, Arg 293	Asp 151, Asp 151, Arg 293, Lys 432	-
1500 piko detik	Asp 151, Glu 228, Arg 118, Arg 293, Arg 293	Asp 151, Asn 344, Glu 425, Arg 225, Thr 226, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Glu 278, Ser 247	Asp 151, Asp 151, Arg 430, Arg 430	Asn 295
2000 piko detik	Lys 150, Asp 151, Glu 228, Arg 118, Lys 143, Lys 150, Arg 293, Asn 344	Asp 151, Glu 425, Arg 152, Arg 225, Arg 225, Arg 225, Arg 293, Lys 432	Asp 151, Glu 278, Arg 152	Glu 119, Glu 119, Asp 151, Arg 225, Arg 225	Gln 136

Tabel 4.5. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 312 K (lanjutan)

2500 piko detik	Glu 278, Lys 143	Glu 119, Glu 425, Arg 225, Arg 225, Arg 225, Arg 293, Lys 432	Glu 278, Ser 247, Asn 295, Asn 344, Asn 344	Glu 119, Glu 119, Glu 228, Glu 228, Arg 118, Arg 156	-
3000 piko detik	Gln 136, Glu 228, Lys 143, Lys 150, Lys 150	Asp 151, Arg 225, Arg 293, Arg 293, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Glu 277, Glu 278, Ser 247	Glu 119, Glu 119, Glu 228, Glu 228, Arg 156	-
3500 piko detik	Thr 226, Glu 228, Glu 278, Lys 143, Lys 150, Lys 150, Thr 226	Arg 368, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Glu 277, His 275, Arg 293, Arg 293	Glu 119, Glu 119, Glu 228, Lys 102, Ser 153, Arg 156, Arg 156	Asp 248
4000 piko detik	Thr 226, Glu 228, Glu 278, Lys 143, Lys 150, Arg 293	Asp 151, Glu 425, Arg 152, Arg 368, Arg 368, Lys 432	Asp 151, Glu 277	Glu 119, Glu 119, Ser 153, Glu 228, Lys 102, Ser 153, Arg 156, Arg 156	Tyr 274, His 275
4500 piko detik	Thr 226, Glu 228, Glu 277, Glu 278, Lys 143, His 144 Lys 150	Asp 151, Glu 425, Arg 368	Asp 151, Glu 278, Gly 342, His 297, Tyr 402	Glu 119, Trp 179, Glu 228, Arg 118, Arg 118, Arg 156, Arg 156, Arg 156	His 275
5000 piko detik	Thr 226, Glu 228, Lys 143, Lys 150	Asp 151, Glu 425, Arg 225, Arg 225, Arg 225	Asp 151, Glu 278,	Glu 119, Thr 148, Glu 228, Arg 156, Arg 156, Arg 430, Arg 430	Asp 248, Asp 248



Tabel 4.5. Kontak residu ligan selama simulasi dinamika molekul 312 K (lanjutan)

Cooling 20 piko detik (setelah akhir simulasi)	Thr 226, Glu 228, Glu 228, Glu 277, Lys 143, Lys 150, Lys 150	Asp 151, Glu 425, Asp 151, Arg 152, Arg 225, Tyr 402	Asp 151, Ser 153, Glu 278, Ser 340, Gly 342, Arg 293	Glu 119, Glu 119, Gly 147, Ser 153, Trp 179, Glu 228, Ser 153, Arg 156, Arg 156, Arg 156, Arg 430	Asp 248
--	---	---	---	---	---------

Ket : Huruf cetak merah merupakan residu sisi katalitik neuraminidase

Temperatur 312 K merupakan temperatur ketika seseorang terinfeksi virus H1N1, maka diharapkan ligan calon obat tetap mampu berada pada kondisi stabil (berikatan dengan sisi katalitik enzim) di temperatur ini. Perubahan kontak residu yang berbeda terjadi bila dibandingkan dengan kontak residu pada temperatur 300 K. Pada simulasi ini, terdapat tahapan pemanasan (*heating*) diawal simulasi setelah inialisasi. Tahap pemanasan inilah yang cukup berpengaruh pada perbedaan ikatan hidrogen di kedua temperatur.

Ligan peptida DNY yang diawal simulasi mampu berikatan dengan sisi katalitik enzim, Glu 278, Arg 118 dan Arg 293. Pada tahap pemanasan (*heating*) ikatan hidrogen dengan Arg 118 menghilang, hingga ligan ini tidak mampu membentuk ikatan hidrogen dengan satu pun sisi katalitik enzim diakhir simulasi. Kedua ligan peptida lainnya (LRL dan NNY) cenderung memiliki ikatan hidrogen yang lebih baik dibandingkan DNY. Ligan LRL diawal simulasi mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Glu 278, Glu 425 dan Arg 293. Pada tahap pemanasan terjadi perubahan interaksi, ikatan hidrogen terbentuk dengan sisi katalitik enzim, Glu 278 dan Arg 293. Ikatan hidrogen dengan Arg 293 ini cukup stabil hingga pada waktu simulasi 3000 piko detik. Kemudian ikatan tersebut menghilang dan ligan justru membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik lain. Diakhir simulasi ligan ini mampu membentuk ikatan hidrogen dengan Asp 151, Glu 425, dan Tyr 402. Ligan NNY diawal simulasi mampu membentuk ikatan

hidrogen dengan sisi katalitik enzim, Arg 118, Arg 293 dan Arg 368. Pada tahap pemanasan ikatan hidrogen hanya terbentuk pada sisi katalitik enzim Arg 293, namun selama simulasi berlangsung interaksi yang terjadi justru bertambah. Hal tersebut dapat diketahui dari ikatan hidrogen yang terbentuk dengan sisi katalitik enzim diakhir simulasi, yaitu dengan residu asam amino Asp 151, Glu 278 dan Arg 293. Ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Asp 151 mulai terbentuk pada waktu simulasi 1000 piko detik, dan tetap stabil sampai akhir simulasi.

Perilaku dinamis ligan standar (zanamivir dan oseltamivir) menunjukkan interaksi ikatan hidrogen yang kurang stabil selama simulasi. Ligan zanamivir yang diawal simulasi mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Arg 293, dan Tyr 402, pada tahap pemanasan hanya mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Asp 151 dan Arg 293. Ketidakstabilan ikatan hidrogen yang terbentuk ditunjukkan dengan tidak adanya sisi katalitik enzim yang terikat sejak waktu simulasi 3000 piko detik hingga akhir simulasi. Hal yang serupa terjadi pada ligan standar oseltamivir. Diawal simulasi ligan ini mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim Glu 278, ikatan yang terbentuk tidak stabil saat waktu simulasi 500 piko detik dan menghilang hingga akhir simulasi. Diakhir simulasi ligan oseltamivir hanya mampu membentuk ikatan hidrogen dengan satu residu asam amino, Asp 248, yang bukan merupakan sisi katalitik enzim. Hasil simulasi dinamika molekul oseltamivir ini konsisten dengan penelitian Cheng, et al tahun 2009 yang melaporkan resistensi terhadap oseltamivir.

Kemudian apabila dilakukan perbandingan interaksi antara hasil simulasi dinamika molekul kedua temperatur, maka diperoleh data interaksi seperti pada tabel berikut.

**Tabel 4.6 Perbandingan interaksi setelah simulasi dinamika molekul kedua temperatur**

Ligan	Temperatur 300 K	Temperatur 312 K
DNY	Asp 151, Glu 228, Asn 344, Arg 152, Arg 225, Arg 225, Arg 293, Arg 301, Arg 301	Thr 226, Glu 228, Glu 228, Glu 277, Lys 143, Lys 150, Lys 150
LRL	Glu 119, Glu 119, Glu 119, Pro 120, Arg 118, Lys 150, Arg 293	Asp 151, Glu 425, Asp 151, Arg 152, Arg 225, Tyr 402
NNY	Asp 151, Glu 228, Gly 345, Glu 425, Glu 425, Arg 152, Arg 225, Arg 293, Trp 296, Lys 347	Asp 151, Ser 153, Glu 278, Ser 340, Gly 342, Arg 293
Zanamivir	Asp 151, Glu 228, Glu 228, Glu 278, Glu 278, Arg 152, Arg 293, Arg 293, Arg 293	Glu 119, Glu 119, Gly 147, Ser 153, Trp 179, Glu 228, Ser 153, Arg 156, Arg 156, Arg 156, Arg 430
Oseltamivir	Asp 151, Glu 228, Glu 228, Glu 278, Glu 278, Arg 152, Arg 293, Arg 293, Arg 293	Asp 248

Ket : Huruf cetak merah merupakan residu sisi katalitik neuraminidase

Penurunan interaksi ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim cenderung terjadi pada simulasi dinamika molekul temperatur 312 K. Pembahasan interaksi difokuskan pada pembentukan ikatan hidrogen pada sisi katalitik enzim, karena ikatan yang terbentuk pada sisi katalitik mampu mengaktivasi enzim dan bereaksi dengan ligan yang berperan sebagai substrat dengan menurunkan energi aktivasi sesuai dengan teori enzim sebagai biokatalis. Sedangkan interaksi ikatan hidrogen pada daerah pengikatan (*binding site*) enzim, hanya membuat ligan terikat tetapi tidak terjadi reaksi antara enzim dengan ligan. Sehingga enzim masih dapat berikatan dengan reseptor pada sel inang, dan proses inhibisi belum tentu terjadi.

Proses inhibisi yang terjadi adalah inhibitor kompetitif antara ligan dengan reseptor (*sialic acid*) pada sel inang. Sehingga dapat dianalisa bahwa ikatan hidrogen yang terbentuk antara ligan dengan sisi katalitik enzim mengakibatkan neuraminidase tidak mampu berikatan dengan reseptor pada sel inang, dan ligan mampu

menginhibisi neuramindase serta memutus rantai replikasi virus H1N1 didalam sel inang.

Ketiga ligan peptida cenderung memiliki interaksi ikatan hidrogen yang baik dengan sisi katalitik enzim selama simulasi, kecuali ligan DNY. Ligan DNY tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim diakhir simulasi. Namun tidak tertutup kemungkinan ligan ini mampu membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik enzim pada keadaan nyata. Hal ini didasarkan bahwa penelitian ini adalah suatu bentuk pemodelan, dengan sistem pelarut yang digunakan adalah sistem implisit dimana pelarut hanya berperan sebagai medium. Berikut ini adalah visualisasi interaksi ligan NNY dengan enzim pada simulasi temperatur 312 K.



**Gambar 4.4 Visualisasi dua dimensi ikatan hidrogen ligan NNY setelah simulasi pada temperatur 312 K**

Ikatan hidrogen antara ligan dengan sisi katalitik enzim terbentuk antara rantai samping Glu 278, dan Asp 151 yang bermuatan negatif dan bersifat asam dengan gugus fungsi  $\text{NH}_3^+$  dari ligan yang bersifat basa. Serta antara rantai samping Arg 293 yang bersifat basa dengan gugus karboksilat dari ligan yang bersifat asam.



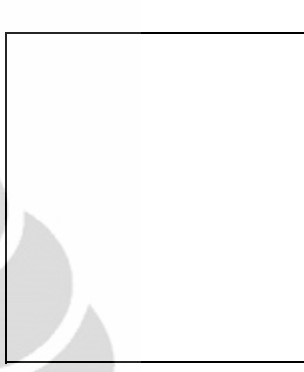



Ikatan-ikatan hidrogen tersebut memberikan kontribusi terhadap afinitas ligan terhadap enzim.

#### 4.9.2 Konformasi

Protein dalam suatu larutan merupakan molekul yang dinamis yang tidak memiliki konformasi tunggal. Pergerakan enzim yang dinamis dapat dilihat pada hasil simulasi dinamika molekul berupa *frame* konformasi yang diamati pada tiap tahap. Pada kedua temperatur, terlihat bahwa pergerakan dinamis yang dialami enzim selama simulasi tetap berbentuk globular. Gambar keseluruhan *frame* konformasi kompleks enzim dan kompleks enzim-ligan hasil simulasi dinamika molekul dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Pengambilan *frame* konformasi selama simulasi bertujuan untuk mengamati konformasi enzim yang terbentuk karena adanya inhibitor serta memvisualisasikan kemampuan ligan berikatan dengan sisi katalitik enzim.




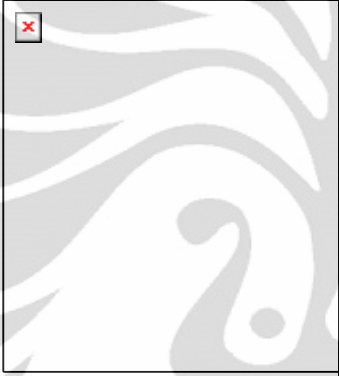
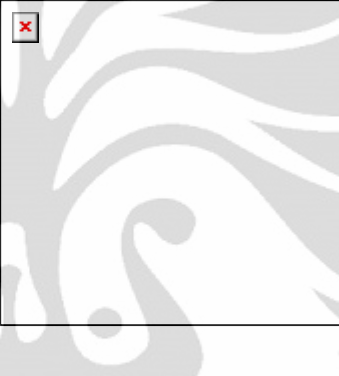
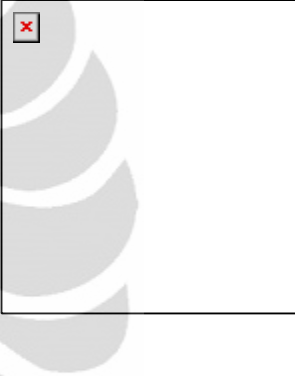
Pengamatan dilakukan terhadap pergeseran konformasi yang terjadi pada ligan selama proses simulasi berlangsung. Ligan ditunjukkan dengan *ball-stick* berwarna kuning dan sisi katalitik enzim ditunjukkan dengan bidang padat pada permukaan enzim. Pengaruh molekul pelarut pada simulasi ini sangat terlihat. Kehadiran molekul pelarut dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi kompleks enzim-ligan. **Gambar 4.5** merupakan *frame* perbandingan konformasi kompleks ligan DNY- enzim pada akhir tahap *docking*, saat inialisasi, dan akhir simulasi pada temperatur yang berbeda. Dari gambar tersebut, dapat teramati pergeseran konformasi ligan pada dua temperatur yang berbeda. Pada temperatur 300 K sampai tahap inialisasi ligan masih dapat menutupi daerah sisi katalitik dengan baik, namun setelah simulasi sisi katalitik enzim mengalami perubahan. Adanya kenaikan temperatur mempercepat terjadinya perubahan konformasi enzim (Ogawa *et al.*, 2008). Hal ini terlihat pada **Gambar 4.5**. Pada temperatur 312K tahap inialisasi enzim mempunyai bentuk konformasi yang berbeda dengan tahap simulasi *molecular docking*. Sisi katalitik tersebut tidak sepenuhnya berada dalam celah (cleft), ligan pun bergerak dinamis tidak sepenuhnya menutupi sisi katalitik. Meskipun ligan bergerak menjauh sisi katalitik, namun masih dapat teramati bagian

ligan yang mem-*block* sisi katalitik. Perilaku serupa ditunjukkan dari simulasi dinamika molekul kompleks ligan DNY-enzim pada temperatur 312 K, dan diakhir simulasi pergerakan dinamis kompleks DNY-enzim mengakibatkan adanya pergeseran posisi ligan terhadap area sisi katalitik enzim.


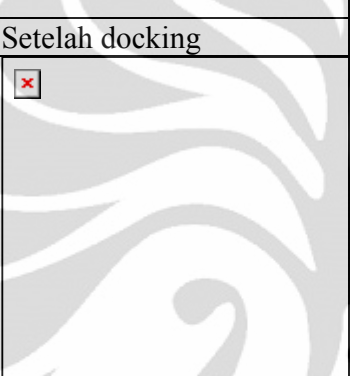

300 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi
312 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi

**Gambar 4.5 Konformasi kompleks ligan DNY-Enzim**

Perilaku yang berbeda ditunjukkan oleh kompleks ligan LRL-enzim (Gambar 4.6) dan kompleks ligan NNY-enzim (Gambar 4.7). Pergerakan dinamis kedua kompleks ligan tersebut pada simulasi di temperatur 300 K dan 312 tetap membuat sisi katalitik enzim berada dalam suatu celah (cleft). Pergeseran yang terjadi pada kedua ligan tersebut hanya mengakibatkan sedikit pergeseran posisi ligan, dan ligan masih dapat mem-*block* sisi katalitik enzim.

300 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi
312 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi

**Gambar 4.6 Konformasi kompleks ligan LRL-Enzim**

300 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisai	Setelah simulasi
312 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi


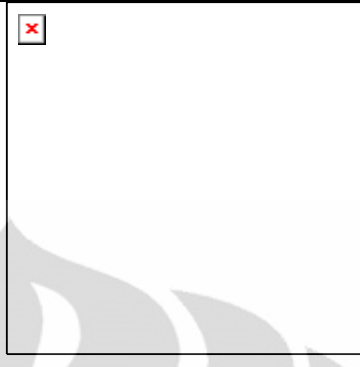
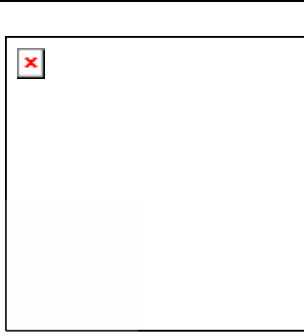
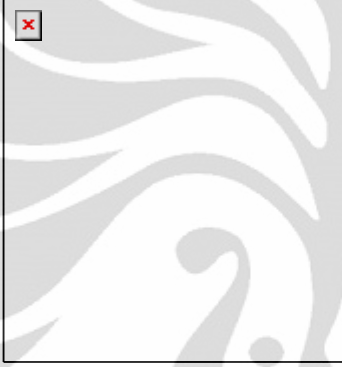
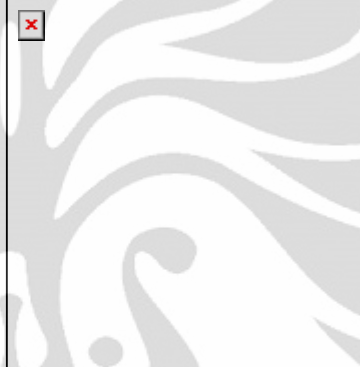
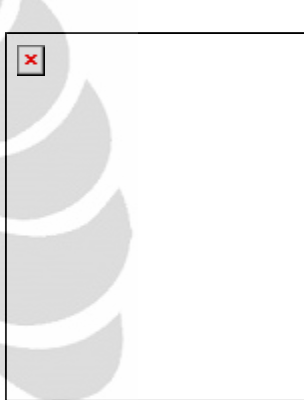
**Gambar 4.7 Konformasi ligan NNY- Enzim**

Pergerakan dinamis kompleks ligan zanamivir-enzim dan oseltamivir-enzim dapat teramati pada **Gambar 4.8** dan **Gambar 4.9**. Pergerakan dinamis kedua kompleks ligan tersebut pada simulasi di temperatur 300 K dan 312 tetap membuat sisi katalitik enzim berada dalam suatu celah (cleft). Pergeseran yang terjadi pada kedua ligan tersebut mengakibatkan pergeseran posisi ligan yang cukup signifikan, dan ligan tidak dapat mem-*block* sisi katalitik enzim. Hal ini terlihat dari *ball-stick* kuning yang menjauhi area sisi katalitik pada akhir simulasi kedua ligan.



300 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi
312 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi

**Gambar 4.8 Konformasi kompleks ligan Zanamivir- Enzim**

300 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi
312 K			
	Setelah docking	Tahap inisialisasi	Setelah simulasi

**Gambar 4.9 Konformasi kompleks ligan Oseltamivir – Enzim**

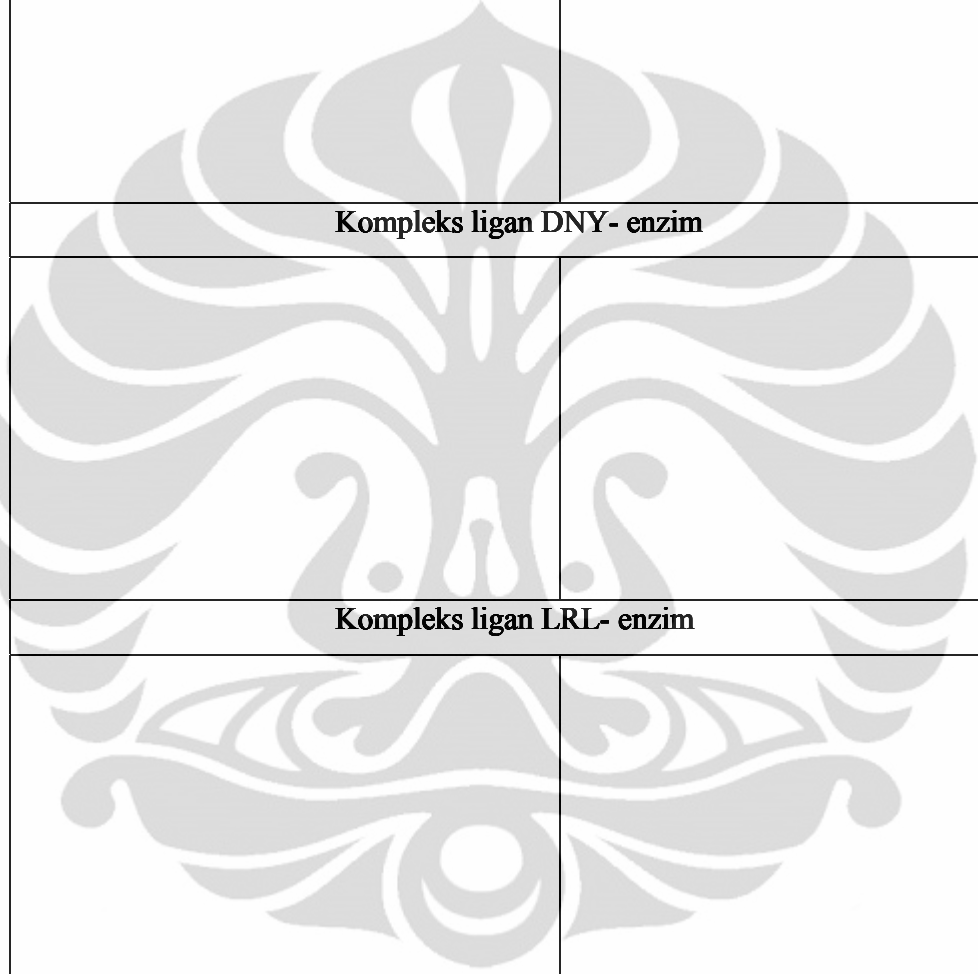
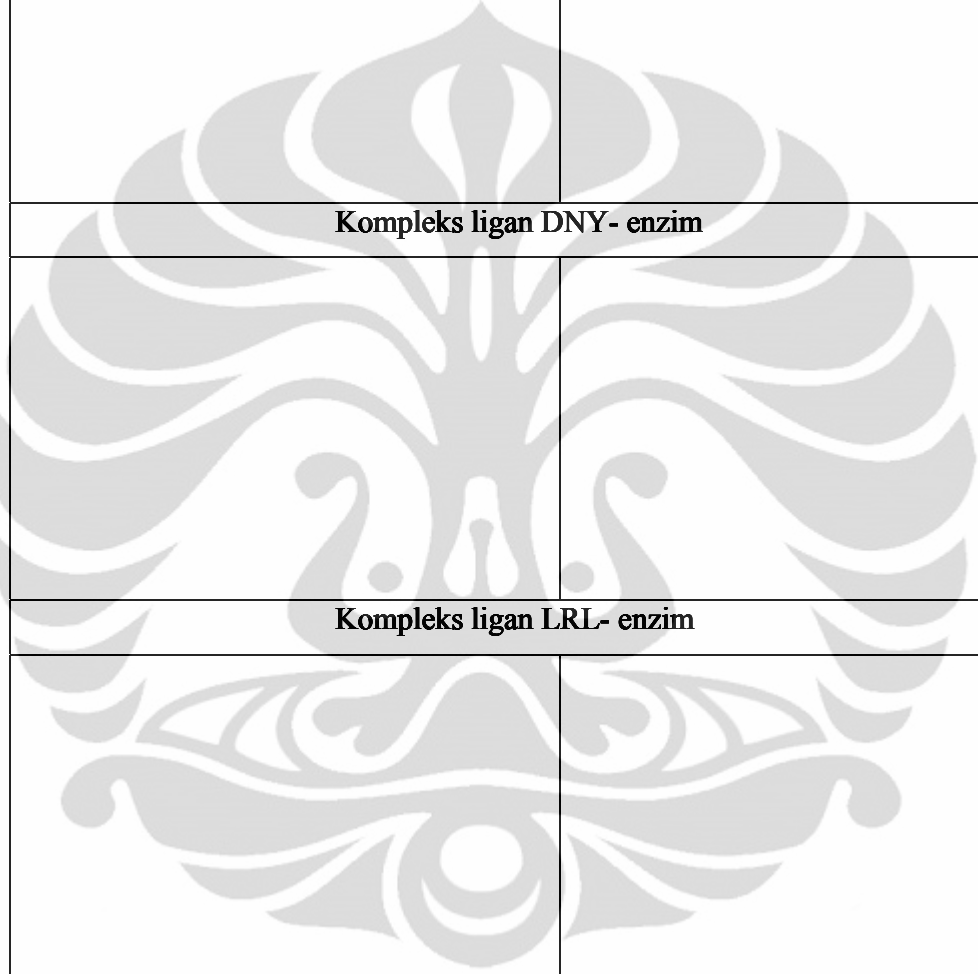
Dari hasil simulasi terhadap ketiga ligan peptida dan dua ligan satandar (zanamivir dan oseltamivir), hanya ligan peptida LRL dan NNY yang membentuk interaksi dengan sisi katalitik enzim hingga tahap *cooling* dari simulasi dinamika molekuler. Bentuk konformasi ligan LRL dan ligan NNY terletak pada sisi katalitik dan membentuk ikatan hidrogen dengan sisi katalitik neuraminidase. Kehadiran kedua ligan peptida ini sebagai kandidat inhibitor neuraminidase menyebabkan proses proteolisis substrat oleh sialidase akan terhambat karena adanya interaksi dengan ligan, sehingga mengakibatkan terganggunya sisi katalitik enzim untuk bisa berikatan dengan reseptor pada sel inang.

### 4.9.3 Analisis *Root-mean-square deviation* (RMSD)

*Root-mean-square deviation* (RMSD) adalah akar kuadrat rata-rata penyimpangan koordinat atom dari posisi referensi. RMSD merupakan ukuran perbedaan struktur protein selama proses simulasi terhadap struktur awal protein (Becker et al., 2001). Analisis ini difokuskan pada perubahan struktur atom C- $\alpha$  asam amino penyusun protein. Untuk mendapatkan gambaran profil kestabilan sistem yang disimulasikan serta tahap-tahap transisi pada proses simulasi, maka hasil analisis RMSD tersebut diplot dalam bentuk grafik antara RMSD terhadap waktu simulasi. Berikut ini adalah grafik kompleks enzim-ligan antara RMSD terhadap waktu simulasi.



**Gambar 4.10** Perubahan nilai RSMD ligan standar

300 K	312 K
<b>Kompleks ligan DNY- enzim</b>	
	
<b>Kompleks ligan LRL- enzim</b>	
	
<b>Kompleks ligan NNY- enzim</b>	

**Gambar 4.10 Perubahan nilai RSMD ligan peptida**

Pada kedua temperatur simulasi menunjukkan pola perubahan nilai RMSD memiliki kesamaan. Nilai RMSD pada waktu simulasi 0 piko detik hingga 5000 ps mengalami peningkatan. Peningkatan nilai tersebut menandai telah terjadinya proses perubahan pergeseran konformasi dan pelipatan struktur enzim.

Berdasarkan analisis RMSD, hasil perubahan konformasi enzim dalam keadaan kompleks dengan ligan pada temperatur simulasi 300 K dan 312 K, memiliki perubahan konformasi yang hampir sama. Konformasi kedua kompleks enzim-ligan tersebut akan mengalami perubahan hingga mendapat konformasi yang stabil.



## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Penelitian dengan metode simulasi dinamika molekul yang dilakukan terhadap kompleks ligan-enzim menunjukkan bahwa pergerakan dinamis kompleks ligan-enzim tersebut dengan kondisi terhidrasi pada kedua temperatur mempengaruhi interaksi ligan terhadap residu asam amino pada neuraminidase virus H1N1. Perubahan interaksi ikatan hidrogen terjadi antara ligan dengan residu asam amino enzim. Hasil simulasi *docking* menunjukkan bahwa ketiga ligan peptida memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim. Setelah dilakukan simulasi dinamika molekul diperoleh bahwa ketiga ligan peptida mampu berikatan dengan *binding site* enzim, namun hanya dua ligan peptida yang tetap berinteraksi dengan sisi katalitik enzim hingga akhir simulasi. Pada akhir simulasi temperatur 300 K, ligan DNY memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Arg 293. Ligan LRL memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Arg 118, Arg 293. Ligan NNY memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Glu 425 dan Arg 293. Pada temperatur 312 K, ligan DNY tidak memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim. Ligan LRL memiliki interaksi dengan sisi katalitik enzim Asp 151, Glu 425, dan Tyr 402. Ligan NNY memiliki interaksi dengan Asp 151, Glu 278 dan Arg 293.

Untuk kesesuaian ligan terhadap konformasi sisi katalitik enzim selama simulasi diperoleh bahwa ligan NNY memiliki kesesuaian dan kestabilan yang baik dalam berinteraksi dengan sisi katalitik enzim. Sedangkan ligan standar oseltamivir mengalami pergeseran konformasi dari daerah sisi katalitik enzim.

#### **5.2 Saran**

Diperlukan studi lebih lanjut mengenai perubahan afinitas ligan pada daerah sisi katalitik enzim dan proses ADMET dari ligan terhadap metabolisme dalam

tubuh serta mempertimbangkan adanya kemungkinan terjadinya mutasi pada enzim akibat pengikatan ligan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, H., Bliznyuk, A.A. & Gready, J.E. (2006). *Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations in Drug Design*. Wiley InterScience. doi: 10.1002/med.20067.
- Amri, N. (2010). *Desain Inhibitor Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 dengan Peptida siklis*. Skripsi program studi kimia Universitas Indonesia
- Apriyanti, N. (2010). *Simulasi Dinamika Molekul Kompleks NS3-NS2B Protease Virus Dengue Dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida*. Skripsi program studi kimia Universitas Indonesia
- Baxevanis, A. D. & Outlette, B. F. (2001). *Bioinformatics A Pratical Guide to the Analysis of Genes and Protein 2<sup>nd</sup> Edition*. Wiley Interscience: USA.
- Becker, O. M., MacKerrel, A. D., Roux, B. & Wtanabe, M. (2001). *Computational Biochemistry and Biophysics*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Cheng, P.K.C., Leung, T.W.C., Ho, E.C.M., Leung, P.C.K., Ng, A.Y.Y., Lai, M.Y.Y., and Lim, . W.W.L. (2009). Oseltamivir and Amantadine-Resistent Influenza Viruses A (H1N1). *Emerging Infectious Disease*. Vol. 15, No. 6 June
- Feher, M. & Williams, C. I. (2009). Effect of input differences on the results of docking calculations. *J. Chem. Inf. Model.*, 49, 1704-1714.
- Gurtler *et al.* (2007). Virology of Human Influenza. In: Influenza Report. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Flying Publisher, Wuppertal. <http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm>.
- Kamps-Hoffman-Preiser. 2006. "Influenza Report 2006". Flying Publisher
- Kitchen, D. B, Decornez H, Furr J. R & Bajorath J. (2004). *Docking and scoring virtual screening for drug discovery: methods and applications*. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(11), 935-49.
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*
- Lehninger. (2004). *Biochemistry 4 Edition*.



- Liu, H & Yao, X. (2009). Molecular basis of the interaction for an essential subunit PA-PB1 in influenza virus RNA *polymerase*: insights from molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Molecular Pharmaceutics*, 7(1),75-85.
- Michaelis, M., Doerr, H.W & Cinatl, J. (2009). An influenza A H1N1 virus revival-pandemic H1N1/09 virus. *Infection.*, 5, 381-389.
- Molecular Operating Environment (MOE 2008.10) CCG Inc 1255 University St., Suite 1600, Montreal, Quebec, Canada H3B 3X3, <http://www.chemcomp.com/>.
- Noviardi, H. (2010). *Perancangan Peptida Siklis Disulfida melalui Simulasi Molecular Docking dan Dynamics sebagai Inhibitor Potensial dari Interaksi Enzim PAC-PB1N Polymerase Virus H1N1*. Thesis program studi kimia Universitas Indonesia.
- Nurbaiti, S. (2009). *Stabilitas termal dan pergerakan dinamis klenow-like DNA polimerase I ITB-1 berdasarkan simulasi dinamika molekul*. Disertasi program studi kimia Institut teknologi bandung.
- Ogawa, H., Nakanoc, M., Watanabe, H., Starikov, E.B., Rothstein S. M. & Tanaka, S. (2008). Molecular dynamics simulation study on the structural stabilities of polyglutamine peptidas. *Computational Biology and Chemistry*, 32, 102-110.
- Panigrahi, S., Desiraju, R, G (2007). Strong and Weak Hydrogen Bonds in the Protein-Ligand Interface. *Wiley Interscience*. DOI: 10.1002/prot.21253
- Rachmania, A.R. (2010). *Modifikasi Oseltamivir sebagai Penghambat Neuraminidase Virus Influenza A Subtipe H1N1 melalui Docking dan Simulasi Dinamika Molekul*. Thesis program studi kimia Universitas Indonesia.
- Rungrotmongkol, T, *et al.* (2009). Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 385, 390-394.
- Sehgal, A. (2006). *New Application in Discovery, Manufacturing, and Therapeutics*. Tracy Beaudoin.
- Sharma, *et al.*, (2009). High temperatur unfolding of *Bacillus anthracis* amidase-03 by molecular dynamics simulations. *Bioinformation*, 3(10), 430-434.

Singh, H., Marla, S. S. & M. Agarwal. (2007). Docking studies of tau protein. *IJCS*, 33,1-7.

Sofyan, A. (2007). *Simulasi bulk polyethylene-oxide menggunakan simulasi dinamika molekul* Program studi Teknik Fisika, Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Bandung.

Tahir, I., Faiz, E.M., et al., (2005). *Analisis sifat fotosensitivitas senyawa antibakteri turunan flurokuinolon berdasarkan data transisi elektronik dan selisih energy orbital homo-lumo*. Departemen Kimia, fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada.

Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. (2006). 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infect. Dis.* 12, 15-22.

Teodoro, M. L., Phillips, G. N., Kavraki, L. E. (2001). Molecular docking: a problem with thousands of degrees of freedom. <http://phillipslab.biochem.wisc.edu/pdfs/108docking.pdf>.

Wang, S.Q., Q.S Du, R.B. Huang, D.W. Zhang, and K.C. Chou. 2009. Insight from investigating the interaction of oseltamivir (Tamiflu) with neuraminidase of the 2009 H1N1 swine flu virus. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 386, 432-436.

Wichapong, Kanin; Somsak Pianwanit, et al. (2009). *Homology modelling and molecular dynamicss simulations of dengue virus NS2B/NS3 protease: insight into molecular interaction*. doi:10.1002/jmr.977.

Witoelar, A. (2002). *Perancangan dan analisa simulasi dinamika molekul ensemble mikrokanonikal dan kanonikal dengan potensial lennard jones*. Departemen Teknik Fisika, Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Bandung.

Zuo, Zhili. et al.,(2009). *Mechanism of NS2B-Mediated Activation of NS3pro in Dengue Virus: Molecular Dynamicss Simulations and Bioassays*.Journal of Virology, doi:10.1128/JVI.01325-08.

[www.influenzareport.com/ir/drugs/oselta.htm](http://www.influenzareport.com/ir/drugs/oselta.htm), diakses 16 Juni 2011, 12.55 WIB

<https://www.medscape.com>, diakses 11 Januari 2011, 12:55 WIB

[www.nejm.org](http://www.nejm.org), diakses 11 Januari 2011, 14:45 WIB

[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html), diakses 11 Januari 2011, 14:45 WIB

<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>, diakses 11 Januari 2011, 15:00 WIB

<http://en.wikipedia.org/wiki/oseltamivir>, diakses 11 Januari 2011, 15:20 WIB

