



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Analisis Pathogenisitas Virus Avian Influenza Tipe A Neuraminidase  
Subtipe 2 (N2) dengan Simulasi Dinamika Molekuler**

**SKRIPSI**

**Sigit Jaya Herlambang**

**0305020853**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FISIKA  
DEPOK  
JUNI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Analisis Pathogenisitas Virus Avian Influenza Tipe A Neuraminidase  
Subtipe 2 (N2) dengan Simulasi Dinamika Molekuler**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana**

**Sigit Jaya Herlambang**

**0305020853**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FISIKA  
DEPOK  
JUNI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Sigit Jaya Herlambang**

**NPM : 0305020853**

**Tanda Tangan :**

**Tanggal : 7 Juni 2010**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Sigit Jaya Herlambang  
NPM : 0305020853  
Program Studi : Fisika Medis dan Biofisika  
Judul Skripsi : Analisis Pathogenisitas Virus Avian Influenza  
Tipe A Neuraminidase Subtipe 2 (N2) dengan  
Simulasi Dinamika Molekuler

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

### DEWAN PENGUJI

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

Penguji 1 : Dr. Mussadiq Musbach ( )

Penguji 2 : Dr. Efta Yudiarsah ( )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 7 Juni 2010

## KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT yang telah dan akan selalu melimpahkan rahmat-Nya bagi kita semua. Segala kebaikan yang datang dengan izin-Nya telah memberikan kelancaran bagi setitik dari samudera ilmu-Nya yang mengalir melalui tulisan skripsi ini. Tak lupa shalawat serta salam Nabi Besar Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya yang menjadi teladan bagi umat manusia.

Adapun penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Fisika pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, selesainya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, dorongan dan doa yang tulus dari banyak pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini. Tanpa itu semua sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulus - tulusnya kepada:

1. Prof. Dr. rer.nat. Rosari Saleh, yang telah membimbing penulis dalam segala hal, baik dalam ilmu pengetahuan, nasehat, omelan, dorongan, semangat serta segala fasilitas yang telah diberikan dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Dr. Mussadiq Musbach sebagai Penguji I dan Dr. Efta Yudiarsah sebagai Penguji II atas diskusinya.
3. Dr. Agus Salam sebagai Ketua Sidang atas kesediaannya.
4. Orangtua penulis: Sang Bapak Terhebat Suharsono dan Ibu Tersabar Ety Rusmiaty; Kakak Tercinta Mbak Widya beserta suaminya Bang Yadi, keponakanku Amanda yang menjadi penghibur, “Pakde Jenggot” yang banyak membantu membesarkan saya dengan filosofi dan Rahma Laras Triarti (thanks for inspiring me so much beautiful melodies in my songs).
5. Dr. Budiman Bella, yang sempat memberi panduan penelitian ini.
6. Mbak Lusi atas bantuannya mengedit-edit kesalahan di SIAK serta nasehat-nasehatnya yang mudah dicerna.
7. Kak Tarto, S.Si., yang telah mengajak dan mengenalkan penelitian ini.

8. Cendmi The English Master, yang banyak membantu meng-*improve* kemampuan bahasa Inggris saya dan juga atas waktu untuk diskusinya.
9. Khari Si Oom, sebagai rekan penelitian yang banyak memberikan kesempatan mendiskusikan penelitian.
10. Hendro The Origin & Japanese Master, atas bantuannya sehingga saya bisa belajar menggunakan Origin dan melatih mengucapkan kata BAKA!!
11. Penghuni ruangan 103A yang belum disebut: Kak Daniel S.Si, Andi The Cina, Yones, Mergo, Dita, Gery, Bagus dll.
12. Kak Andes Gautama S.Si yang beberapa kali mengingatkan syarat-syarat skripsi.
13. Semua mantan rekan penelitian.
14. Ding Ming Chee Accelrys Discovery Studio Singapura.
15. Pak Mardi The Key Master, atas kesabarannya dan permintaan tolong saya pinjam kunci ruangan 103A yang hampir setiap hari.
16. Mbak Ratna, atas bantuannya selama saya kuliah dan mengurus berkas TA sehingga memudahkan saya menjalankannya.
17. Seluruh staff yang bekerja di Universitas Indonesia yang memberikan kontribusi (baik langsung maupun tidak langsung) dalam kelancaran selama kuliah dan pembuatan TA.
18. Teman – teman seperjuangan fisika angkatan 2005, yang membuat saya merasa punya keluarga kedua.
19. Sahabat-sahabat fisika 2005 saya: Rangga, Fandi, Imam, Ipin, Eno, Satrio Jati, Uda Al, Surya, Nendar, Kholidin, Fadli, Ira Autis, Ninik, Tiwul, Nenek Anggi dan lain-lain. Maaf bila tidak semua disebutkan. Im happy being around y'all.
20. Buat (alm) Fanny Azizi, selamat jalan bung! Tunggu saya di seberang sungai Styx.
21. Buat teman-teman fisika medis dan biofisika angkatan 2005, 2006 dan 2007: lanjutkan api juangku.
22. Terima kasih untuk semua orang yang membantu saya selama kuliah dan pembuatan TA yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu.

23. Teman-teman di markas sastra: Bimo, Kimung, Agrita, Agung dll yang sempat menjadi pelarian saya dari kakunya cara berpikir saintis FMIPA UI. Katanya pindah markas yah? Kalau ada lomba lagi jangan lupa bilang2 ya...
24. Teman-teman di luar kampus yang membantu saya melepas penat: Ahya, Rudi, Ma'ruf, Bang Dion (Yanni emang dbest bang), Kamal, Merem, adikku Angel, Anton, Uche Ghotic "*In Goth We Trust*", Sinyo The Screamer, Gigay, Ivan, Jiunk Petrucci, Troy (vox Oracle) dan lain-lain. Semoga kita bisa tetap main musik bersama hingga not terakhir hidup kita. Amin. Oia, tidak lupa makasi juga buat Barry Likumahuwa, John Myung dan Steve diGiorgio yang "mengajari" saya bagaimana bermain bass.

Penulis masih menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan tugas akhir ini. Oleh sebab itu sangat diharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dalam upaya perbaikan tugas akhir ini.

Semoga skripsi ini dapat berguna bagi siapa saja yang mengkajinya, serta dapat dikembangkan dan disempurnakan agar lebih bermanfaat untuk kepentingan orang banyak.

Depok, 7 Juni 2010

Penulis

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

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

Nama : Sigit Jaya Herlambang  
NPM : 0305020853  
Program Studi : S1 Fisika  
Departemen : Fisika  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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

**Analisis Pathogenisitas Virus Avian Influenza Tipe A Neuraminidase Subtipe 2  
(N2) dengan Simulasi Dinamika Molekuler**

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

Dibuat di : Depok

Pada Bulan : Juni 2010

Yang menyatakan

(Sigit Jaya Herlambang)



## ABSTRAK

Nama : Sigit Jaya Herlambang  
Program Studi : Fisika  
Judul : Analisis Pathogenisitas Virus Avian Influenza Tipe A  
*Neuraminidase* Subtipe 2 (N2) dengan Simulasi Dinamika  
Molekuler

*Neuraminidase* (NA) memiliki peran penting dalam melepaskan virion yang menggantung pada *sialic acid* (SA) sel inang sehingga dapat menginfeksi sel inang lainnya dan meningkatkan pathogenisitas virus. Untuk dapat mengetahui lebih dalam tentang pengaruh kontribusi residu fungsional terhadap ikatan antara NA dengan SA dilakukan simulasi permodelan molekuler dengan membandingkan NA *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 dan *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) A/Tokyo/3/67. Dari penelitian diperoleh energi bebas ikatan NA-SA HPAI dan LPAI sebesar -231.59 kcal/mol dan -350.62 kcal/mol. Analisis okupansi dan energi ikatan menunjukkan bahwa Asp151, Arg152, Glu276, Arg292 dan Arg371 merupakan residu fungsional yang berperan penting pada aktivitas enzimatik NA virus dan berperan besar dalam menentukan pathogenisitas virus. Kemudian dari analisis mutasi diketahui D147G, V149I, I194V, K199R, V275I, I290V, V303I, T346N, Q347P, L370S, S400N, D401N, R403W dan K431P memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kestabilan ikatan di wilayah aktif.

Kata kunci: *neuraminidase*, pathogenisitas, residu fungsional, mutasi, influenza unggas.

## ABSTRACT

Name : Sigit Jaya Herlambang  
Study Program : Fisika  
Title : Molecular Dynamic Simulation of Subtype 2  
*Neuraminidase* (N2) of Avian Influenza A Virus  
Pathogenicity Analysis

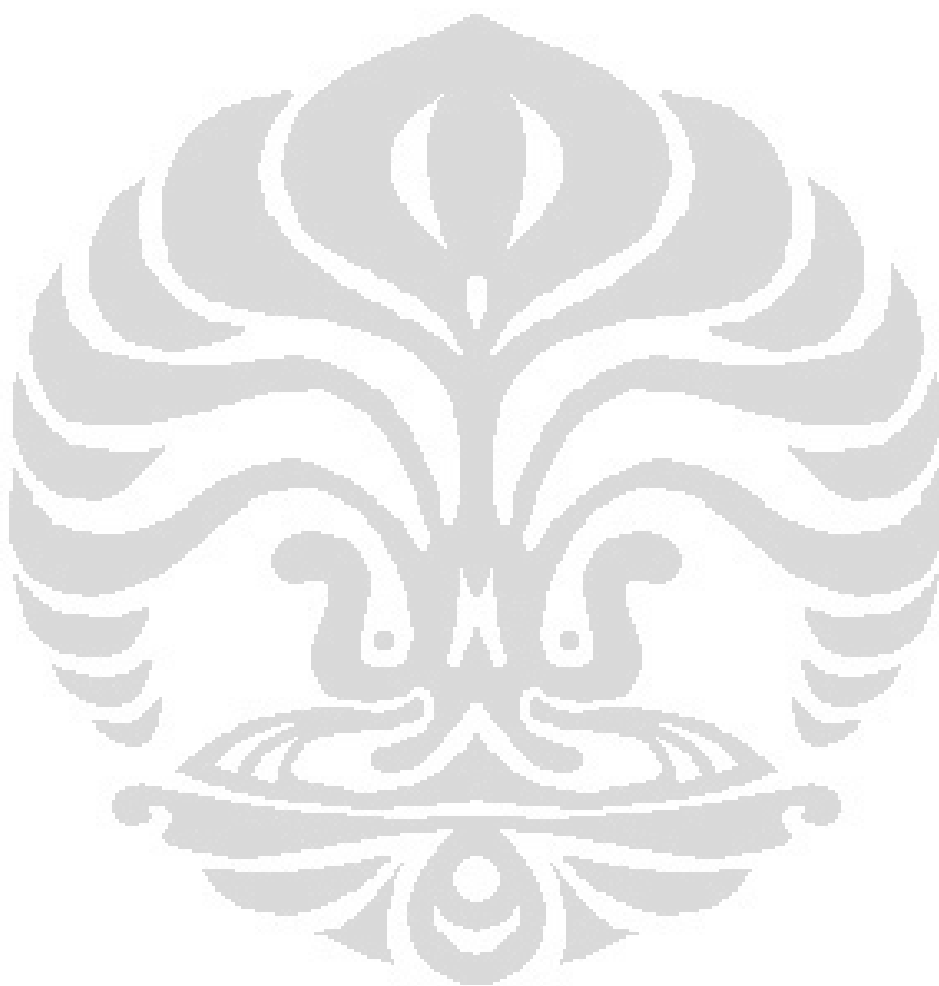
*Neuraminidase* (NA) has a significant role in releasing virions that are attached to the *sialic acid* (SA) of the host cells so that the new virions could infect other cells and increasing the virus pathogenicity. To gain insight on the effects of the contribution of the functional residues towards the binding of NA with SA, we conducted a molecular dynamics simulation and compared Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) NA A/Mallard/Pennsylvania/10218/84[1] with High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) NA A/Tokyo/3/67[2]. From this study we obtained the binding free energy of the NA-SA HPAI and LPAI with the value of -231.59 kcal/mol and -350.62 kcal/mol respectively. Hydrogen bond occupancy analysis and binding energy showed that Asp151, Arg152, Glu276, Arg292 and Arg371 are functional residues that have a significant role on the enzymatic activities of the NA and also have a big responsibility to determine virus pathogenicity. And then from the mutation analysis it was observed that D147G, V149I, I194V, K199R, V275I, I290V, V303I, T346N, Q347P, L370S, S400N, D401N, R403W and K431P mutations has the most influence on bond stability at the active site.

Keywords: *neuraminidase*, pathogenicity, functional residues, mutation, avian influenza

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	viii
ABSTRAK .....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2 AVIAN INFLUENZA: NEURAMINIDASE DAN SIALIC ACID.....</b>	<b>6</b>
2.1 Virus Influenza.....	7
2.1.1 Struktur Virus dan Siklus Hidupnya.....	8
2.1.1.1 Struktur Virus.....	8
2.1.1.2 Siklus Hidup Virus.....	10
2.1.2 Neuraminidase.....	11
2.1.3 Pathogenisitas .....	13
2.2 Sialic Acid .....	14
2.2.1 Struktur .....	14
2.2.2 Fungsi .....	15
2.3 Interaksi <i>Neuraminidase</i> dengan <i>Sialic Acid</i> .....	15
<b>BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>18</b>
3.1 Pathogenisitas berdasarkan <i>Neuraminidase</i> .....	20
3.1.1 Penelitian <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	20
3.1.1.1 Neuraminidase meningkatkan kemampuan menginfeksi virus influenza.....	21
3.1.1.2 Pathogenisitas dipengaruhi oleh panjang <i>Neuraminidase</i> .....	22
3.1.2 Penelitian <i>In Silico</i> .....	23
<b>BAB 4 METODE .....</b>	<b>25</b>
4.1 <i>Sequence Alignment</i> .....	25
4.1.1 <i>Pairwise Sequence Alignment</i> .....	26
4.2 Permodelan Homologi.....	27
4.3 <i>CHARMm Forcefield</i> .....	28
4.4 Minimisasi Energi .....	31
4.4.1 <i>Steepest Descent</i> .....	32
4.4.2 <i>Conjugate Gradient</i> .....	33
4.5 Simulasi Dinamika Molekuler .....	34
4.6 Penghitungan Energi Bebas Ikatan .....	35
<b>BAB 5 PENGOLAHAN DATA, HASIL &amp; DISKUSI.....</b>	<b>36</b>
5.1 Pengolahan Data.....	36
5.1.1 Analisis Sekuen Asam Amino HPAI dan LPAI .....	36
5.1.2 Permodelan Homologi.....	37

5.1.3 Penambahan Air (Solvasi) dan Aplikasi Medan Gaya/Mekanika Molekuler .....	38
5.1.4 Minimisasi Energi & Simulasi Dinamika Molekuler .....	38
5.2 Persentase Okupansi Residu yang Berikatan Langsung dengan substrat .....	44
5.3 Analisis Perubahan Konformasi Struktur.....	45
5.3.1 Analisis Ikatan Hidrogen .....	45
5.3.2 Analisis Mutasi .....	61
<b>BAB 6 KESIMPULAN.....</b>	<b>82</b>
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>85</b>

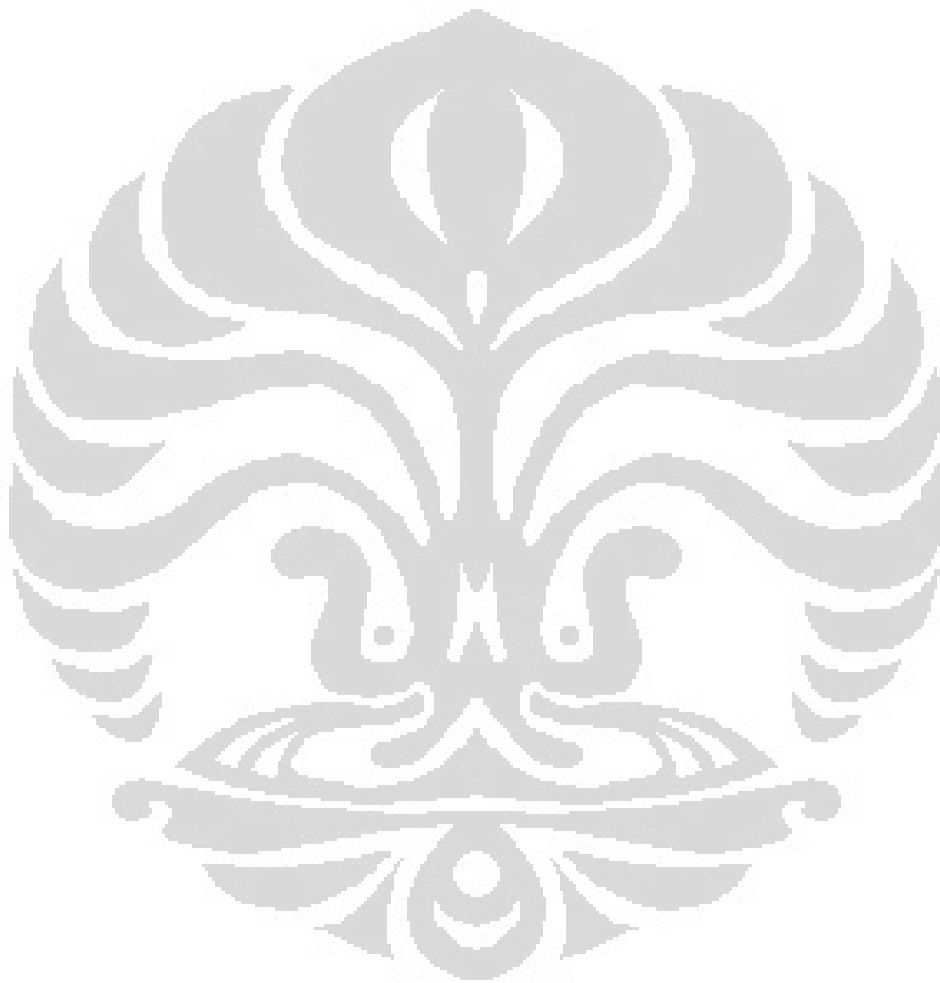


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Grafik Perbandingan Jumlah Korban Virus Influenza Unggas pada 3 Pandemi Utama abad ke-20.....	2
Gambar 1.2	Data Kasus Influenza Unggas A/(H5N1) pada Manusia 2003-2010 .....	3
Gambar 2.1	Struktur Penyusun Virus Influenza.....	9
Gambar 2.2	Siklus Hidup Virus Influenza .....	11
Gambar 2.3	Residu-residu yang termasuk <i>Active Site</i> .....	12
Gambar 2.4	Struktur <i>Sialic Acid</i> .....	14
Gambar 2.5	Residu-residu pada Wilayah Aktif <i>Neuraminidase</i> yang Berperan Penting dalam Proses Pemotongan Penghubung Virion dengan Sel Inang .....	16
Gambar 2.6	Langkah Reaksi Katalitik NA-SA .....	17
Gambar 3.1	Virion akan tetap menggantung pada <i>Sialic Acid</i> di Sel Inang bila <i>Neuraminidase</i> tidak melakukan perannya dalam Siklus Hidup Virus.....	19
Gambar 3.2	Contoh Wilayah Batang yang Mengalami Pemendekan pada Virus Influenza Unggas yang Lebih Pathogenik .....	22
Gambar 3.3	Wilayah Batang Istimewa yang Kehilangan 20 Asam Amino .....	23
Gambar 4.1	Bagan Penelitian Simulasi Dinamika Molekuler.....	25
Gambar 4.2	Tipe pengeditan sekuen yang mungkin terjadi pada DNA .....	26
Gambar 4.3	(a)Contoh matriks yang dihasilkan algoritma <i>dynamic programming</i> .....	27
	(b)Contoh sistem lacak balik dalam menentukan urutan sekuen dan penentuan penyertaan gap dalam <i>alignment</i> .....	27
Gambar 4.4	Peregangan Ikatan.....	29
Gambar 4.5	Pembengkokan Sudut .....	29
Gambar 4.6	Sudut Torsional.....	30
Gambar 4.7	<i>Out-of-plane</i> atau <i>Improper Torsion</i> .....	30
Gambar 4.8	Minimisasi Energi pada Metode <i>Steepest Descent</i> .....	32
Gambar 4.9	Minimisasi Energi pada Metode <i>Conjugate Gradient</i> .....	33
Gambar 5.1	Sequence Alignment LPAI (deret atas) dan HPAI (deret bawah) ....	36
Gambar 5.2	<i>Fitting</i> Struktur <i>Backbone</i> Molekul LPAI (warna biru) dan HPAI (warna merah).....	37
Gambar 5.3	Penambahan Air dalam Permodelan Struktur.....	38
Gambar 5.4	Grafik Temperatur terhadap Waktu .....	40
Gambar 5.5	Perbandingan grafik Energi Total terhadap <i>Simulation Step</i> model NA-SA HPAI dan LPAI .....	40
Gambar 5.6	Perbandingan Grafik Energi Potensial terhadap <i>Simulation Step</i> model NA-SA HPAI dan LPAI .....	41
Gambar 5.7	Perbandingan Grafik Energi Kinetik terhadap <i>Simulation Step</i> model NA-SA HPAI dan LPAI .....	42
Gambar 5.8	Grafik Perbandingan <i>rmsd all atoms</i> dan <i>backbone</i> HPAI-LPAI selama simulasi .....	43
Gambar 5.9	Perbandingan Persentase Okupansi Residu Fungsional LPAI-HPAI .....	44

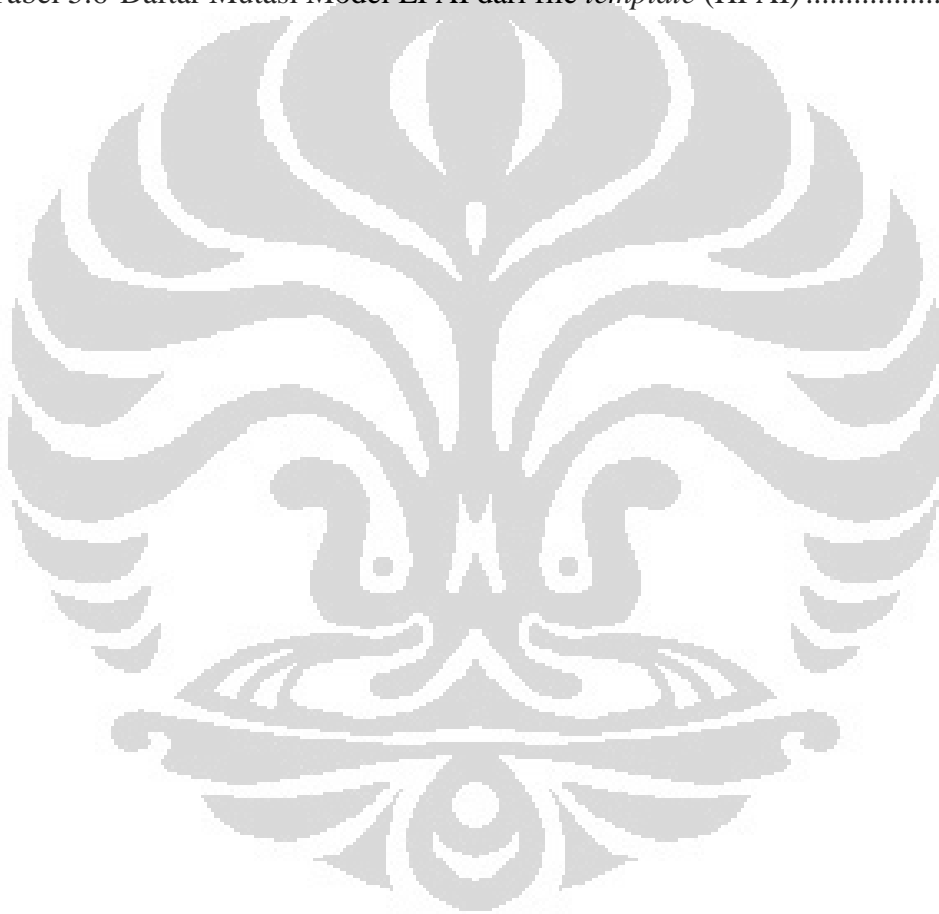
Gambar 5.10(a) Grafik energi ikatan hidrogen, energi elektrostatik dan energi van der waals di konformasi akhir simulasi interaksi NA-SA HPAI .....	45
(b) Grafik energi ikatan hidrogen, energi elektrostatik dan energi van der waals di konformasi akhir simulasi interaksi NA-SA.....	46
Gambar 5.11 Residu fungsional yang berikatan langsung dengan SA pada NA HPAI di akhir simulasi: Asp151, Arg152, Glu276, Arg292 dan Arg371 .....	47
Gambar 5.12 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap <i>simulation step</i> pada S1 kompleks NA-SA HPAI .....	49
Gambar 5.13 Grafik jarak ikatan hidrogen berbanding <i>simulation step</i> pada S3 kompleks NA-SA HPAI .....	50
Gambar 5.14 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S4 kompleks NA-SA HPAI.....	51
Gambar 5.15 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S5 kompleks NA-SA HPAI.....	52
Gambar 5.16 Asp151 (bawah) yang berinteraksi dengan dua cara dengan <i>sialic acid</i> (atas): langsung dan tidak langsung (perantara air) .....	53
Gambar 5.17 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu dari Asp151 kompleks NA-SA HPAI .....	54
Gambar 5.18 Residu fungsional yang berikatan langsung dengan SA pada NA LPAI di akhir simulasi: Asp151, Arg224, Glu276 dan Arg371 .....	55
Gambar 5.19 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S1 kompleks NA-SA LPAI .....	56
Gambar 5.20 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S3 kompleks NA-SA LPAI .....	57
Gambar 5.21 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S4 kompleks NA-SA LPAI .....	57
Gambar 5.22 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S5 kompleks NA-SA LPAI .....	58
Gambar 5.23 Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada Asp151 dan Tyr406 kompleks NA-SA LPAI.....	59
Gambar 5.24 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 127 NA LPAI-HPAI .....	62
Gambar 5.25 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 147 dan 149 NA LPAI-HPAI .....	63
Gambar 5.26 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 172 NA LPAI-HPAI.....	64
Gambar 5.27 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 194 dan 199 NA LPAI-HPAI .....	65
Gambar 5.28 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 210 NA LPAI-HPAI .....	66
Gambar 5.29 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 258 NA LPAI-HPAI.....	67
Gambar 5.30 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 263 dan 269 NA LPAI-HPAI .....	68
Gambar 5.31 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 275 NA LPAI-HPAI.....	69
Gambar 5.32 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 284, 286 dan 290 NA LPAI-HPAI .....	70
Gambar 5.33 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 303 dan 308 NA LPAI-HPAI .....	72
Gambar 5.34 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 331, 334 dan 339 NA LPAI-HPAI .....	73
Gambar 5.35 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 346 dan 347 NA LPAI-HPAI .....	74
Gambar 5.36 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 360 NA LPAI-HPAI.....	75
Gambar 5.37 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 370 dan 378 NA LPAI-HPAI .....	76
Gambar 5.38 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 384 dan 386 NA LPAI-HPAI .....	77
Gambar 5.39 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 392 NA LPAI-HPAI.....	78

Gambar 5.40 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 400, 401 dan 403 NA LPAI-HPAI .....	78
Gambar 5.41 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 414 NA LPAI-HPAI.....	79
Gambar 5.42 <i>Fitting</i> Mutasi Residu 431 NA LPAI-HPAI.....	80



## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Energi Potensial setelah Proses Minimisasi Tahap I dan II .....	39
Tabel 5.2 Energi Total, Potensial dan Kinetik sistem pada akhir simulasi .....	41
Tabel 5.3 Perbandingan Energi Bebas Ikatan dan RMSD.....	54
Tabel 5.4 Data kontribusi energi masing-masing ikatan di konformasi terakhir simulasi interaksi NA-SA HPAI .....	55
Tabel 5.5 Data kontribusi energi masing-masing ikatan di konformasi terakhir simulasi interaksi NA-SA LPAI.....	60
Tabel 5.6 Daftar Mutasi Model LPAI dari file <i>template</i> (HPAI) .....	61



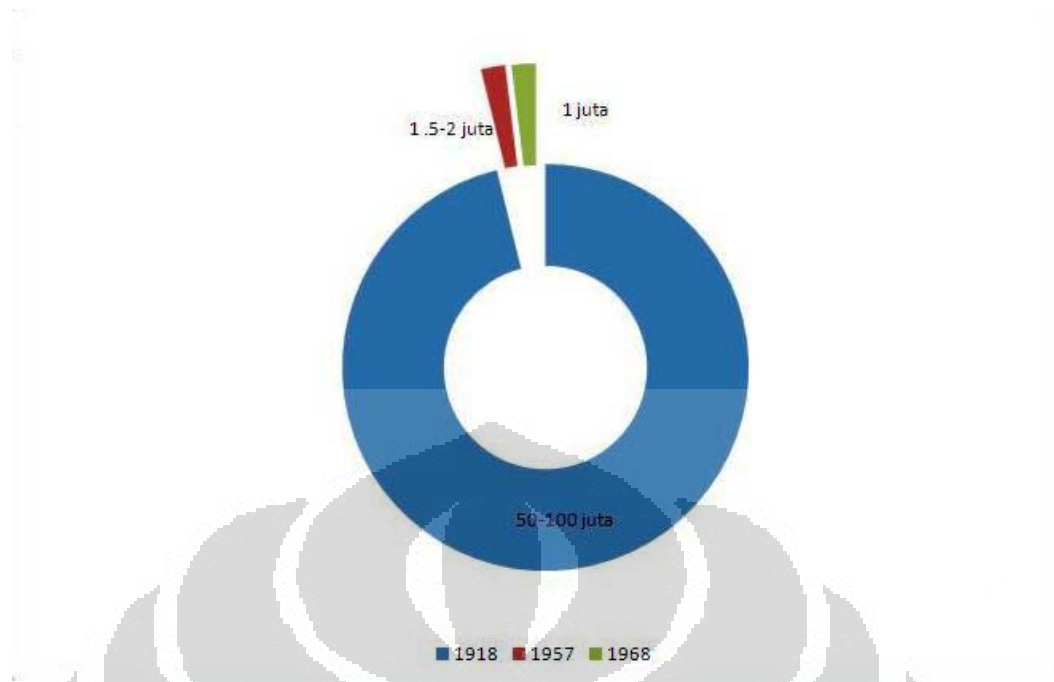


# BAB I

## PENDAHULUAN

*Avian Influenza Virus* (AIV) merupakan virus penyebab wabah penyakit yang dikenal luas sebagai pandemi flu burung. Virus influenza yang awalnya hanya menyerang unggas air ini menginfeksi saluran pernapasan bagian atas spesies yang diserangnya [1]. Dalam satu abad terakhir, virus ini menjadi ancaman bagi manusia karena kemampuan virus bermutasi hingga menjadi bersifat sangat pathogen dan memiliki kemampuan bertransmisi sangat efektif. Dalam *Influenza Report* yang dirilis tahun 2006 [2], Kamps dan Reyes-Teran mengatakan bahwa setiap tahunnya, dalam masa pandemi, terdapat 3-5 juta kasus dan menyebabkan 300.000-500.000 kematian. Resiko kematian terlihat signifikan pada anak-anak usia < 2 tahun, orang tua > 65 tahun serta mereka yang memiliki kondisi tidak sehat [3].

Selama abad 20, terjadi 3 puncak pandemik utama dimana flu menjadi wabah yang merenggut jutaan nyawa (lihat gambar 1.1). Yakni pada 1918 (dikenal sebagai *Spanish Flu*), 1957 (*Asian Flu*) dan 1968 (*Hongkong Flu*). Pada 1918, pandemik disebabkan oleh virus H1N1 yang secara filogenetik memiliki kedekatan dengan *strain/galur* unggas dibanding sekuen mamalia lainnya [4]. Pada 1957, virus H2N2 yang menyerang banyak wilayah di Asia memiliki *hemagglutinin*, *neuraminidase* dan *polimerase* PB1 yang sama dengan virus influenza unggas, sementara H3N2 yang menyebar pada pandemik 1968 hanya *hemagglutinin* dan *polimerase* PB1 saja yang memiliki kesamaan dengan galur unggas [5].



Gambar 1.1: Grafik Perbandingan Jumlah Korban Virus Influenza Unggas pada 3 Pandemi Utama abad ke-20 [6,7,8].

Pada saat ini, kejadian yang berhubungan dengan influenza unggas relatif sedikit. Munculnya galur baru yang lebih pathogen, dikenal dengan H5N1, menjadi sasaran penelitian di berbagai belahan dunia karena kemampuannya menginfeksi sekitar 10 juta ternak dengan area geografis yang lebih luas selama 2 tahun lebih mulai tahun 1997. Kasus pertama yang menyerang manusia tercatat oleh WHO terjadi pada tahun 2003 di Vietnam [9]. Hingga kini, terdapat 495 kasus yang terdaftar yang menyebabkan 292 kasus kematian dan Indonesia menjadi penyumbang kasus terbesar dengan 163 kasus dan 135 kematian (lihat gambar 1.2).

Kemampuan virus influenza unggas untuk menciptakan pandemik secara luas ditentukan oleh kemunculan subtype virus influenza unggas jenis baru yang sangat pathogen dan memiliki kemampuan menyebar luas [10]. Salah satu faktor virus menjadi sangat pathogen adalah dari kemampuan virion untuk merontokkan diri usai proses replikasi dari tepi sel inang yang ditentukan oleh aktivitas enzimatis *neuraminidase* [11].



**Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO**

21 April 2010

Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		Total	
	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	1	0	0	0	9	7
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	7	4	0	0	38	25
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	39	4	19	7	109	34
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	21	19	1	1	163	135
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's Democratic Republic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	5	5	7	2	119	59
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	44	33	73	32	27	10	495	292

Total number of cases includes number of deaths  
 WHO reports only laboratory-confirmed cases  
 All dates refer to onset of illness  
 Indonesia numbers indicate cumulative total of sporadic cases and deaths which occurred during 2009.

Gambar 2.2: Data Kasus Influenza Unggas A(H5N1) pada Manusia 2003-2010 [9].

Pathogenisitas virus influenza unggas dapat dilihat dari aktivitas enzimatis neuraminidase dengan membandingkan frekuensi dan jumlah virion yang telah melepaskan diri dari sel inang beberapa jam pasca-penyuntikan [12]. Enzim yang memegang peran penting mengkatalisis proses lepasnya virion dapat dipandang sebagai molekul, yang secara umum, terkomposisi oleh atom-atom yang memiliki partikel-partikel bermuatan dengan posisi geometri berbeda-beda. Karakterisasi struktur molekul dari *neuraminidase* virus influenza unggas dari sejumlah galur telah memungkinkan para peneliti dari bidang lain seperti fisika untuk membantu melakukan analisis struktural dan fungsional yang kemudian dapat dihubungkan dengan aktivitas enzimatisnya. Sehingga disain struktur obat inhibitor dapat dirancang dengan informasi yang lebih banyak. Hal tersebut terbukti dari pesatnya pengajuan inhibitor potensial yang lebih kuat berikatan dengan enzim *neuraminidase* [1]. Namun, ada satu hal yang tak bisa dipungkiri dari virus influenza unggas ini. Yakni adanya peristiwa mutasi yang dapat menyebabkan munculnya virus baru yang lebih pathogenik yang berpotensi mengulang pandemik yang terjadi sebelumnya. Hal inilah yang mendasari bahwa perlu adanya kajian lebih dalam pada substrat alami *neuraminidase*.

Simulasi yang dilakukan dengan memberikan medan gaya pada molekul dapat memberikan tambahan informasi interaksi enzim *neuraminidase* dengan substrat alami. Fokus utama penelitian adalah wilayah aktif dari enzim *neuraminidase* yang bertugas mengkatalisis substrat. Batasan wilayah penelitian hanya sampai pada interaksi residu fungsional dengan substrat agar dapat mengerucutkan penelitian ke depannya. Sehingga dapat dilakukan penelitian lanjutan tentang residu mana yang bila dimutasikan mampu menambah kemampuan mengikat *sialic acid* dibanding obat inhibitorynya.

Penelitian permodelan interaksi salah satu antigen virus influenza ini dilakukan untuk membandingkan pathogenisitas virus influenza unggas. Dengan mengambil salah satu virus yang dikarakterisasi saat terjadi pandemik 1968 yang juga merupakan *template* model bagi virus influenza unggas yang lebih rendah pathogenisitasnya diharapkan dapat membandingkan model yang digenerasikan lewat metode permodelan homologinya dengan *template* sekaligus. Hasil

penelitian tersebut dijelaskan dalam enam bab secara sistematis agar dapat dipahami dengan mudah. Dalam bab I Pendahuluan, dijelaskan latar belakang masalah yang dikaji berhubungan dengan influenza unggas dan metode baru yang diusulkan sebagai alternatif memprediksi pathogenisitas virus berdasarkan interaksi enzim *Neuraminidase* (NA) virus dengan *sialic acid* (SA). Bab II membahas virus influenza unggas secara umum yang meliputi penjelasan struktur dengan fungsi masing-masing, proses replikasi, serta kajian yang lebih detail pada antigen enzimatik yang menjadi bagian penelitian beserta substrat alaminya. Bab III mengkaji ulang penelitian-penelitian yang telah dilakukan para peneliti lain yang menghubungkan tingkat pathogenisitas virus dengan kemampuan enzim *neuraminidase* dalam memotong virion dari sel inang yang terinfeksi (pasca replikasi virus) di bagian *sialic acid*-nya. Bab IV membahas metode-metode yang dipakai selama penelitian. Bab V membahas pengolahan data serta analisisnya yang dilanjutkan dengan kesimpulan akhir pada Bab VI.

## BAB II

### INFLUENZA UNGGAS: *NEURAMINIDASE* DAN *SIALIC ACID*

Influenza merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus yang bisa menyerang baik manusia dan hewan. Pada hewan, penyakit ini mempunyai potensi yang cukup besar untuk menjadi sebuah epidemik karena tingkat imunitas yang rendah dari hewan tersebut. Lebih spesifik, virus influenza unggas dapat menjadi epidemik yang lebih menakutkan lagi. Hal ini disebabkan oleh kebiasaan unggas liar bermigrasi di musim-musim tertentu.

Meskipun spesies inang utama influenza unggas adalah unggas air, namun virus ini dapat ditransfer ke spesies unggas lain (seperti ayam dan kalkun) dan bahkan mamalia. Ketika virus ini diketahui dapat berpindah ke spesies unggas lain, virus diklasifikasikan menjadi dua jenis berdasarkan pathogenisitasnya. Virus yang mempunyai kemampuan untuk menjadi pandemik luas (epidemi) akan dikategorikan sebagai *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Selain yang dikategorikan sebagai HPAI, virus termasuk *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI).

Transfer virus influenza antar spesies masih memiliki potensi untuk mewabah secara global. Terdapat dua teori utama yang menyebabkan perpindahan virus influenza antar spesies dapat terjadi. Teori pertama mengatakan galur virus influenza A pada unggas dapat berpindah secara langsung ke manusia tanpa perubahan genetik. Di dalam sel inang, apabila orang tersebut sedang terserang influenza manusia yang menyebabkan tingkat imunitasnya rendah sehingga dapat diserang virus influenza unggas, maka akan terjadi pencampuran genetik antara virus influenza unggas dengan virus influenza manusia. Pencampuran genetik tersebut akan menyebabkan *hemagglutinin* dan *neuraminidase* mengalami modifikasi sehingga bisa menyerang manusia yang sedang dalam kondisi imun terbaik sekalipun [13].

Teori yang kedua mengatakan virus influenza unggas tersebut menyerang spesies penghubung (contoh: babi). Kemudian virus tersebut mengalami

pencampuran genetik atau mungkin perubahan kode genetik (*mutagenesis*) yang menyebabkan perubahan antigen utama sehingga muncul galur virus baru yang dapat beradaptasi dengan manusia. Teori ini dapat lebih dipercaya karena memang pada babi terdapat *epithelium* pernapasan yang mengandung reseptor HA virus influenza unggas SA $\alpha$ 2,3Gal dan reseptor HA virus influenza manusia SA $\alpha$ 2,6Gal sekaligus [13].

Babi merupakan hewan perantara yang dapat memodifikasi RNA virus. Hingga saat ini, belum dapat dipastikan bagaimana cara bermutasi dan seperti apa mutasi itu akan mengarah. Pada 1997, mulai muncul galur virus yang melompati hewan perantara. Virus influenza unggas langsung berpindah dari unggas ke manusia [14]. Hal yang paling ditakuti adalah ketika suatu saat muncul galur virus influenza yang dapat berpindah dari manusia ke manusia. Pada saat itu akan terjadi epidemik yang lebih luas lagi.

Studi virologi yang belakangan ini gencar dilakukan berhasil menjelaskan struktur, mekanisme dan siklus hidup virus. Dengan dimengertinya hal tersebut, sejumlah target telah menjadi sasaran dalam penelitian pembuatan obat seperti *hemagglutinin*, *neuraminidase*, protein matriks M2 dan *endonuklease* [15]. Di antara target-target tersebut, *neuraminidase* menjadi target yang paling penting [16] dalam mencegah virus yang telah menyerang untuk menginfeksi sel-sel sehat dengan cepat.

## 2.1 Virus Influenza

Virus influenza, yang merupakan famili virus *Orthomyxoviridae*, dikategorikan menjadi empat tipe utama A, B dan C. Virus ini berbentuk *pleomorfik* dengan ukuran bervariasi antara 80-120 nm yang di dalamnya terdapat 890 hingga 2341 nukleotid pada tiap-tiap virus [17]. Tipe virus dikenali dengan keberadaan *hemagglutinin* dan *neuraminidase* sebagai antigen utamanya. *Hemagglutinin* dan *neuraminidase* merupakan *glikoprotein transmembran* yang tersebar merata di permukaan virus tersebut. Masing-masing berperan sebagai penempel dan pelepas virus dari sel inang.

Pada virus influenza tipe A, pengelompokan sub tipe yang didasarkan pada antigenik, analisis *nukleotida* dan susunan asam aminonya ini dibagi menjadi 16 kelompok HA (H1-H16) dan 9 kelompok NA (N1-N9) [18,19]. *Genom* tipe A berbentuk *single-stranded RNA* yang dilapis *nukleokapsid* dan memiliki polaritas negatif. Total terdapat 144 macam kombinasi virus influenza tipe A yang 103 di antaranya terdapat pada burung liar.

Umumnya, sistem penamaan virus dilakukan berurutan berdasarkan tipe virus influenza, spesies inang, letak geografis, nomor seri, tahun pengisolasian dan varian HA dan NA dalam kurung. Sebagai contoh: A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1).

### **2.1.1 Struktur Virus dan Siklus Hidupnya**

#### **2.1.1.1 Struktur Virus**

Struktur virus influenza tipe A dan B terdiri dari 8 segmen terpisah sebagai berikut:

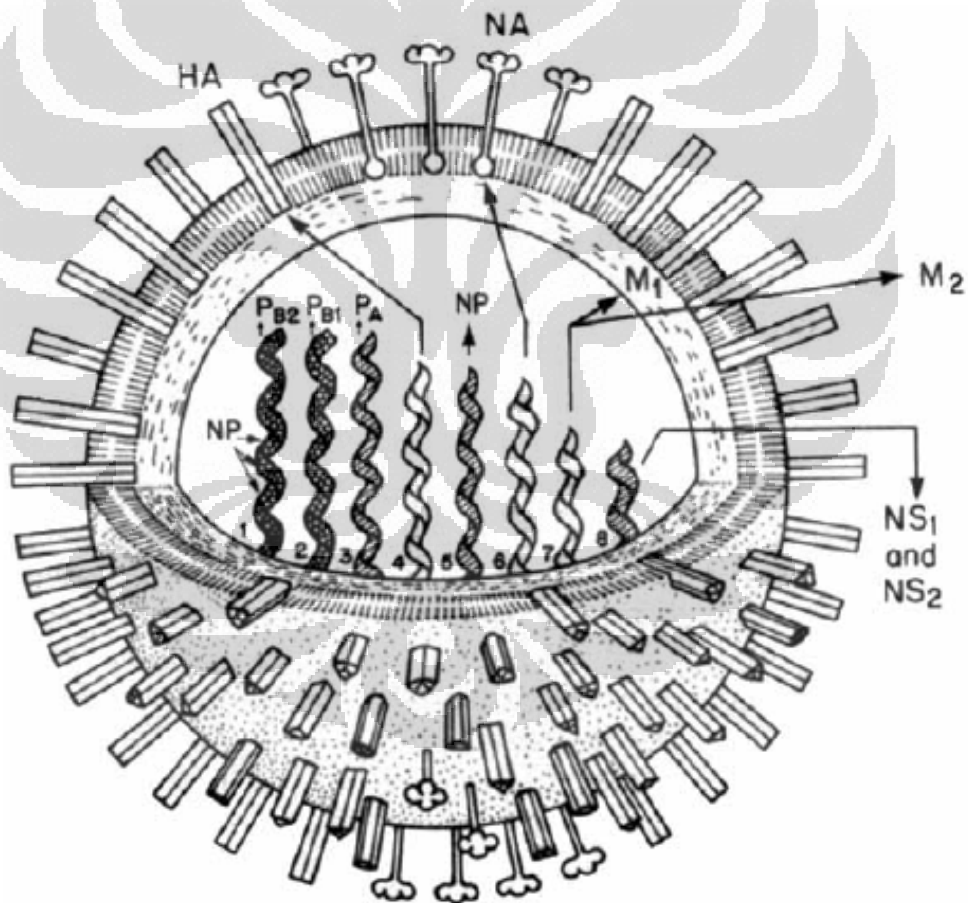
1. Protein *Polimerase* B1 (PB1)
2. Protein *Polimerase* B2 (PB2)
3. Protein *Polimerase* A (PA)
4. *Hemagglutinin* (HA atau H)
5. *Neuraminidase* (NA atau N)
6. Protein *Nukleokapsid* (NP)
7. Protein Matriks (M); terdiri dari protein matriks 1 dan 2 (M1 dan M2)
8. Protein Non-struktural (NS); terdiri dari NS1 dan NS2.

Struktur virus secara keseluruhan terdiri dari 8 segmen. Masing-masing memiliki peran tersendiri yang tak dapat diabaikan. *Polimerase* aktif RNA (PB1, PB2 dan PA) berperan dalam proses replikasi dan transkripsi di inti sel inang yang terinfeksi. *Hemagglutinin* memiliki peran sebagai penghubung awal antara virus dengan sel yang akan diinfeksi. *Neuraminidase* melakukan tugasnya di akhir proses siklus hidup virus dengan memotong virion (virus muda) yang masih



menggantung di tepian sel inang yang terinfeksi. Protein *nukleokapsid* berfungsi sebagai pembungkus virus.

Morfologi virus sepenuhnya diatur oleh protein matriks 1. Morfologi virus diketahui dapat mengalami perubahan. Saat virus diisolasi secara klinis, virus berbentuk seperti kawat filament akan tetapi setelah melewati proses kultur sel, virus merubah morfologinya menjadi bentuk sferik (terutama pada influenza manusia). Protein matriks 2 berfungsi sebagai pemompa saluran ion untuk merendahkan dan mengatur pH endosom agar dapat melakukan proses fusi. Protein non-struktural yang terdiri dari NS1 dan NS2 berfungsi sebagai regulator sintesis komponen viral dalam sel yang terinfeksi.



Gambar 2.1: Struktur Penyusun Virus Influenza [18]

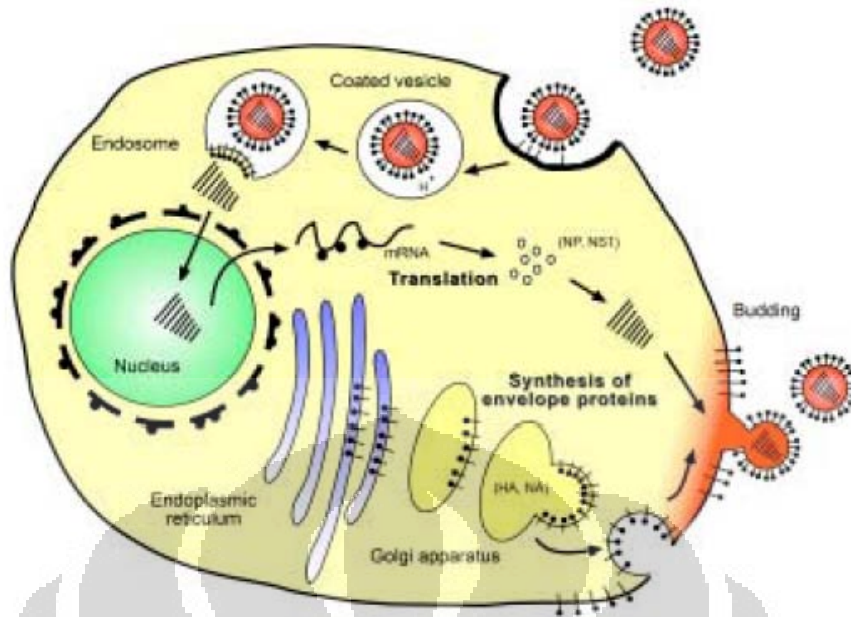
### 2.1.1.2 Siklus Hidup Virus

Terdapat tiga fase penting dalam siklus replikasi virus influenza. Yakni, penempelan, replikasi rna dan proses lepasnya virion dari sel inang.

*Penempelan.* Virus influenza menempelkan dirinya dengan menggunakan HA ke *sialic acid* dari sel inang. Pada unggas HA menempel ke penghubung alpha 2,3 sedang pada manusia menempel ke penghubung alpha 2,6 [20]. Spesifikasi penghubung ini awalnya sedikit melindungi terjadinya transfer virus antar spesies. Namun, karena adanya *antigenic shift* pada virus influenza unggas menyebabkan virus menjadi sangat pathogen dan dapat berpindah antar spesies. Setelah virus menempel, protein M2 yang merupakan protein yang bertanggung jawab atas terjadinya fusi akan bekerja untuk dapat melepaskan *ribonukleoprotein* (RNP) ke *sitoplasma* sel inang. Peristiwa membukanya *nukleokapsid* dan pelepasan RNP terjadi sekitar 20-30 menit setelah menempelnya virus ke permukaan sel inang.

*Replikasi RNA.* Delapan segmen RNA virus yang dilepas ke *sitoplasma* kemudian menuju *nukleus* untuk melakukan transkripsi mRNA. Di sinilah protein PB1, PB2 dan protein PA virus melakukan perannya [21]. Setelah terjadi translasi, protein virus akan dibungkus oleh protein *nukleokapsid* dan akan tumbuh dan bermunculan di tepian sel inang yang terinfeksi dengan *hemagglutinin* virus masih menempel pada *sialic acid*.

*Pelepasan Virion.* Virus yang telah melakukan replikasi akan bermunculan di tepian sel inang. Virion-virion akan meng-*cluster* di lapisan *mucous* saluran pernapasan, usus, lapisan *endothelial*, *myocardium* dan otak [17]. Dan selama masa infeksi, virus juga ditemukan di sel darah dan cairan tubuh lainnya. Tanpa NA, mereka akan tetap di tepian sel inang tanpa pernah bisa menginfeksi sel inang lainnya.



Gambar 2.2: Siklus Hidup Virus Influenza [11]

### 2.1.2 Neuraminidase

*Neuraminidase* adalah satu dari dua *glikoprotein* yang tersebar di permukaan virus dan berfungsi memotong *sialic acid* dari *glikoprotein*, *glikolipid* dan *oligosakarida* di permukaan sel inang [22]. *Neuraminidase* berbentuk struktur *tetramer* (4 *monomer* identik) dengan tiap *monomer* mengandung rantai *polipeptida* tunggal [23]. Sebagian besar molekul NA terdapat di luar permukaan virus. Bagian yang lain menembus lapisan lipid dengan buntut *sitoplasmik* kecil di ujung lainnya.

*Neuraminidase* sebagai katalisator adalah sejenis enzim. Berfungsi untuk mengkatalisis *sialic acid* yang terdapat pada sel inang. Ketika virus muda (*virion*) yang telah melakukan proses replikasi di sel inang mulai matang, ia akan tetap menggantung di permukaan sel inang tersebut hingga *sialic acid* yang menghubungkan HA dengan *glikolipid* sel inang berhasil dipotong oleh *neuraminidase*.

*Neuraminidase* terbagi dalam dua kelompok berdasarkan konformasi wilayah aktifnya. Grup 1 dengan bentuk konformasi terbuka terdiri dari N1, N4,

N5 dan N8. Grup 2 dengan bentuk konformasi tertutup terdiri dari N2, N3, N6, N7 dan N9 [24,25].

Studi struktural dan fungsional dari enzim *sialidase* ini begitu berperan dalam pencarian inhibitor yang berpotensi untuk dijadikan obat. Penelitian *neuraminidase* selalu berada di sekitar wilayah aktifnya. Pada NA sub tipe N2, wilayah tersebut termasuk Arg118, Glu119, Tyr121, Leu134, Asp151, Arg152, Trp178, Asp198, Arg224, Glu227, Asp243, His174, Glu276, Glu277, Arg292, Asp330, Lys350 dan Glu425 [23]. Diharapkan dengan melihat spesifikasi ikatan dari masing-masing sub tipe NA, suatu hari akan ditemukan obat yang berfungsi menghambat seluruh jenis virus influenza dengan sub tipe virus yang berbeda-beda.



Gambar 2.3: Residu-residu yang termasuk Active Site [23]

### 2.1.3 Pathogenisitas

Pathogenisitas merupakan tingkat seberapa mampu virus memproduksi wabah penyakit [26]. Influenza unggas diklasifikasi menjadi dua tingkat berdasarkan pathogenisitasnya. Yakni, *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Klasifikasinya didasarkan pada kemampuan virus untuk bertransmisi di antara spesies yang dapat terinfeksi.

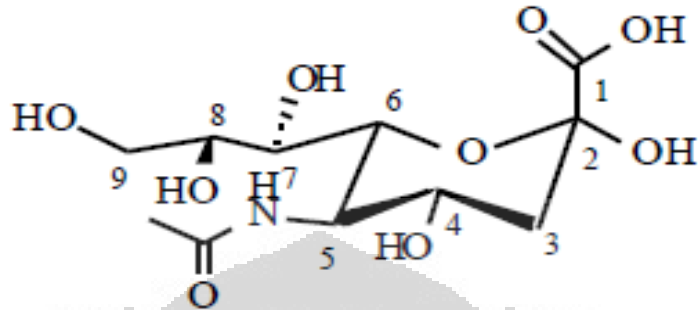
Organisasi dunia untuk kesehatan binatang, yang dikenal luas sebagai *Office Internationale des Epizooties* (OIE), telah menetapkan berdasarkan uji *in vivo* bahwa virus influenza unggas yang diisolasi dapat diklasifikasikan sebagai HPAI apabila mampu membunuh lebih dari 75% ayam usia 4-6 minggu dalam waktu 10 hari pasca-penyuntikan dan memiliki *Intravenous Pathogenicity Index* (IVPI) lebih besar dari 1,2 [27]. Selain itu, semua virus influenza unggas disebut LPAI. Sejumlah isolasi dianggap lebih pathogenik lagi bila membunuh 100% dalam 36-48 jam pasca-penyuntikan [28].

Pathogenisitas juga ditentukan oleh sejumlah faktor. Dari sel inang, reseptor target pada sel inang, kemampuan enzim dalam sel inang yang penting untuk proses masuknya virus dan replikasi & sistem imunitas dapat menjadi faktor pathogenisitas. Dari virus itu sendiri, pathogenisitas dilihat dari kemampuan untuk berikatan dengan sel inang, kemampuan merontokkan diri virion, kemampuan mengelabui sistem imun dan kemampuan melakukan proses replikasi virus itu sendiri.

Penelitian ini dilakukan untuk memberikan informasi tambahan sekaligus menguji salah satu faktor penentu tingkat pathogenisitas virus avian influenza. Yakni, tentang kemampuan virion merontokkan diri dari sel inang setelah cukup matang.

## 2.2 Sialic Acid

### 2.2.1 Struktur



Gambar 2.4: Struktur Sialic Acid [18]

Struktur *sialic acid* terdiri dari gugus *karboksil*, gugus *amin*, rantai samping dan gugus *hidrofobik* yang dihubungkan dengan sembilan karbon *backbone*. *Sialic acid* berada hampir di seluruh jaringan hewan dan beberapa tanaman dan jamur.

Berdasarkan studi *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR) yang membandingkan struktur molekular suatu enzim dengan aktivitas biologinya, telah dijelaskan bahwa wilayah yang berikatan dengan *neuraminidase* dibagi menjadi empat wilayah utama [14]. Wilayah-wilayah tersebut dinamai berdasarkan kantung karbonnya masing-masing.

#### Kantung Karbon C1

Kantung karbon C1 adalah wilayah yang berinteraksi dengan Arg118, Arg292 dan Arg371 untuk menstabilkan ikatan NA-SA. Wilayah ini merupakan gugus *karboksilat* yang bermuatan negatif.

#### Kantung Karbon C4

Kantung karbon C4 adalah wilayah yang berinteraksi dengan Asp151, Glu119 dan Glu227. Wilayah bermuatan positif ini merupakan gugus yang berisikan rantai samping yang dapat dimodifikasi untuk mendapatkan inhibitorynya.

### **Kantung Karbon C5**

Kantung karbon C5 merupakan gugus amin yang memperkuat ikatan NA-SA. Wilayah ini berinteraksi dengan Arg152, Trp178, Ile222 dan Arg224.

### **Kantung Karbon C6**

Kantung karbon C6 adalah kantung *hidrofobik* yang berinteraksi dengan Ala246, Glu276 dan Glu277.

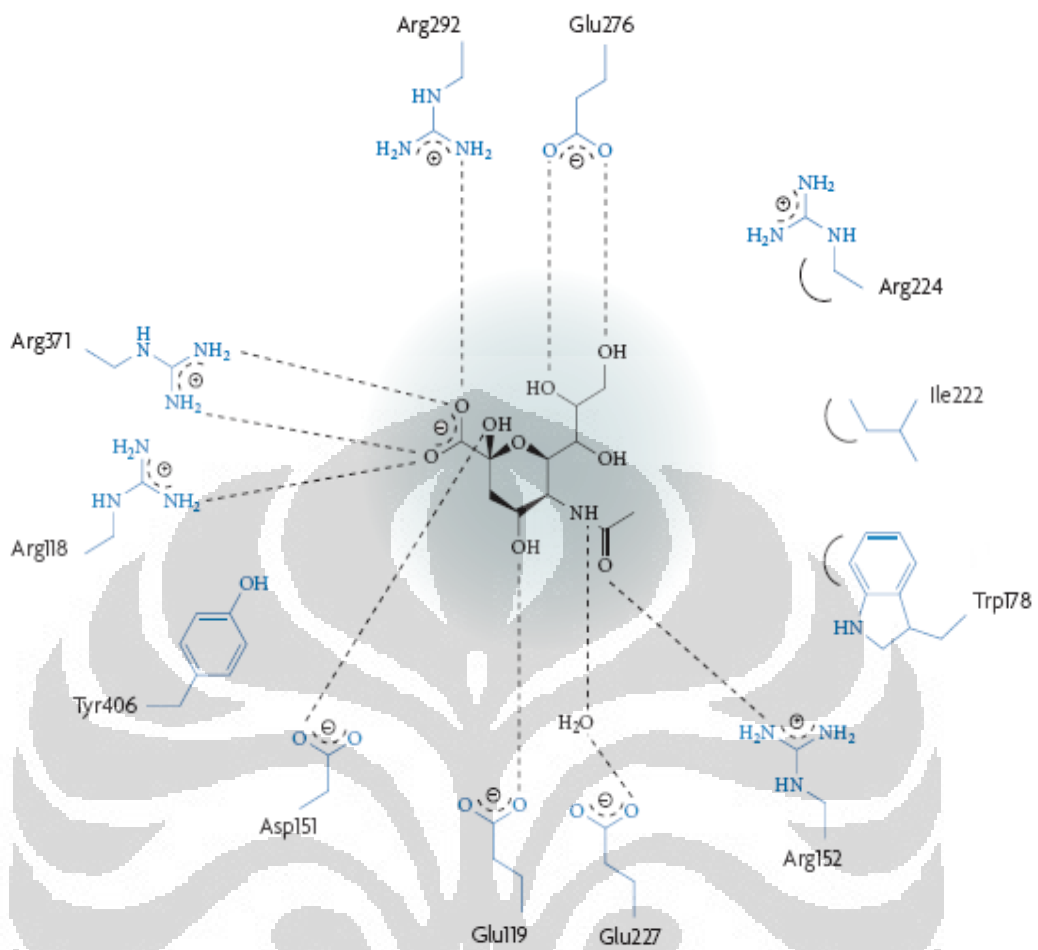
#### **2.2.2 Fungsi**

Fungsi utama dari *sialic acid* adalah menjadi reseptor ikatan. Pada influenza, *sialic acid* berperan menjadi reseptor HA virus saat akan memasuki sel inang dan juga pengikat virus yang tumbuh di tepian sel inang. Pada awal penelitian tentang perontokkan virion dari sel inang, *sialic acid* disintesis untuk menghambat laju perontokkan virion dengan membentuk ikatan di wilayah katalitik NA yang seharusnya mengkatalisis SA yang mengikat virion. Namun, di kemudian hari setelah diketahui dengan memodifikasi rantai samping dari SA didapatkan inhibitor yang memiliki ikatan lebih kuat [29], maka disintesislah penghambat yang lebih kuat interaksinya dengan NA.

### **2.3 Interaksi Neuraminidase dan Sialic Acid**

Terdapat empat langkah utama proses pelepasan virion dari sel inang. Langkah pertama adalah peristiwa pengikatan yang dilakukan Arg118, Arg292 dan Arg371 terhadap SA kantung C1. Kemudian diikuti ikatan Tyr406 sebagai penyeimbang.

Langkah kedua adalah reaksi katalitik yang melibatkan molekul H<sub>2</sub>O. Asp151 yang menjadi kunci utama pemotongan akan menarik rantai samping SA. Arg152 dan Glu227 diduga menjadi residu yang menstabilkan penarikan rantai samping.

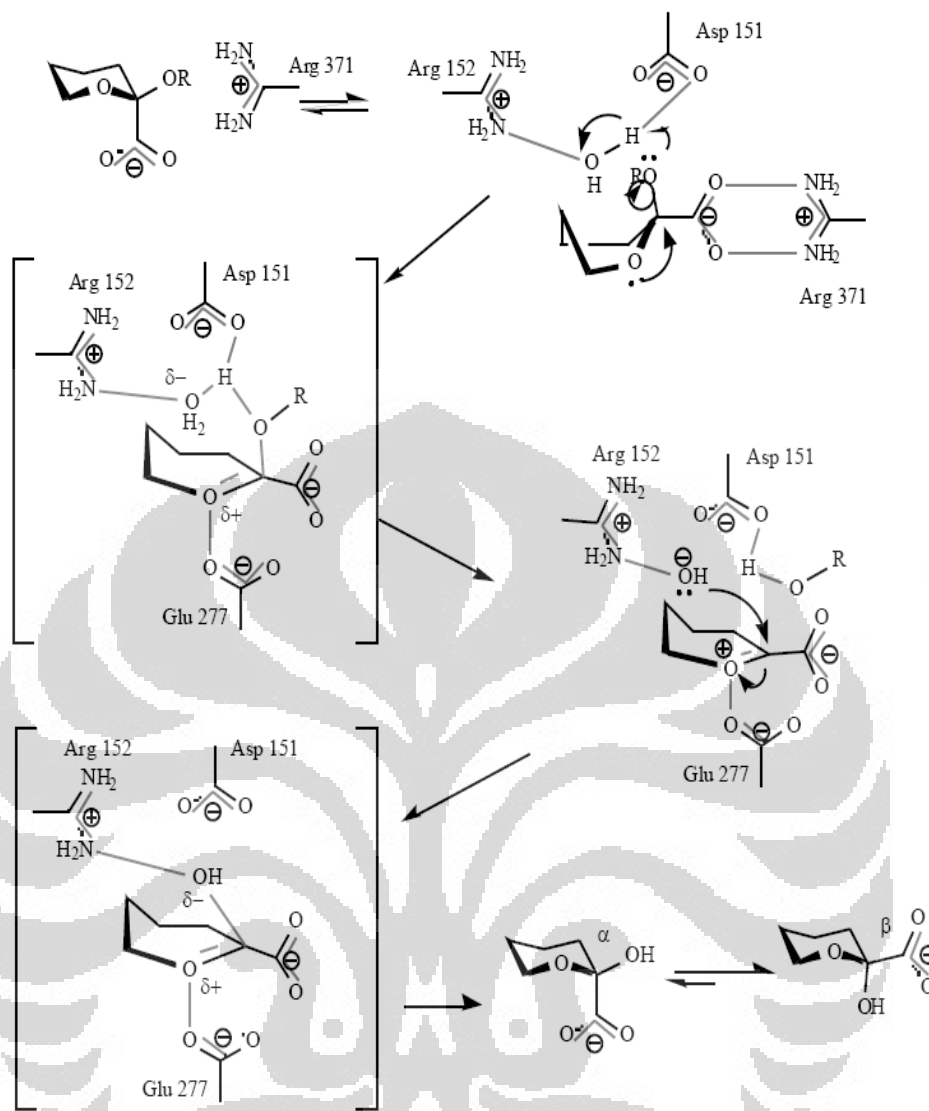


Gambar 2.5: Residu-residu pada Wilayah Aktif Neuraminidase yang Berperan Penting dalam Proses Pemotongan Penghubung Virion dengan Sel Inang [30]

Langkah ketiga adalah pembentukan Neu5Ac dengan terjadinya ikatan antara OH sisa molekul air dengan SA yang sudah tidak memiliki rantai samping.

Langkah keempat adalah pelepasan yang diakibatkan gaya tolak yang disebabkan terjadinya *mutarotasi* dari Neu5Ac  $\beta$ -*anomer* menjadi  $\alpha$ -*anomer*.





Gambar 2.6: Langkah Reaksi Katalitik NA-SA [18]

### BAB III

#### TINJAUAN PUSTAKA

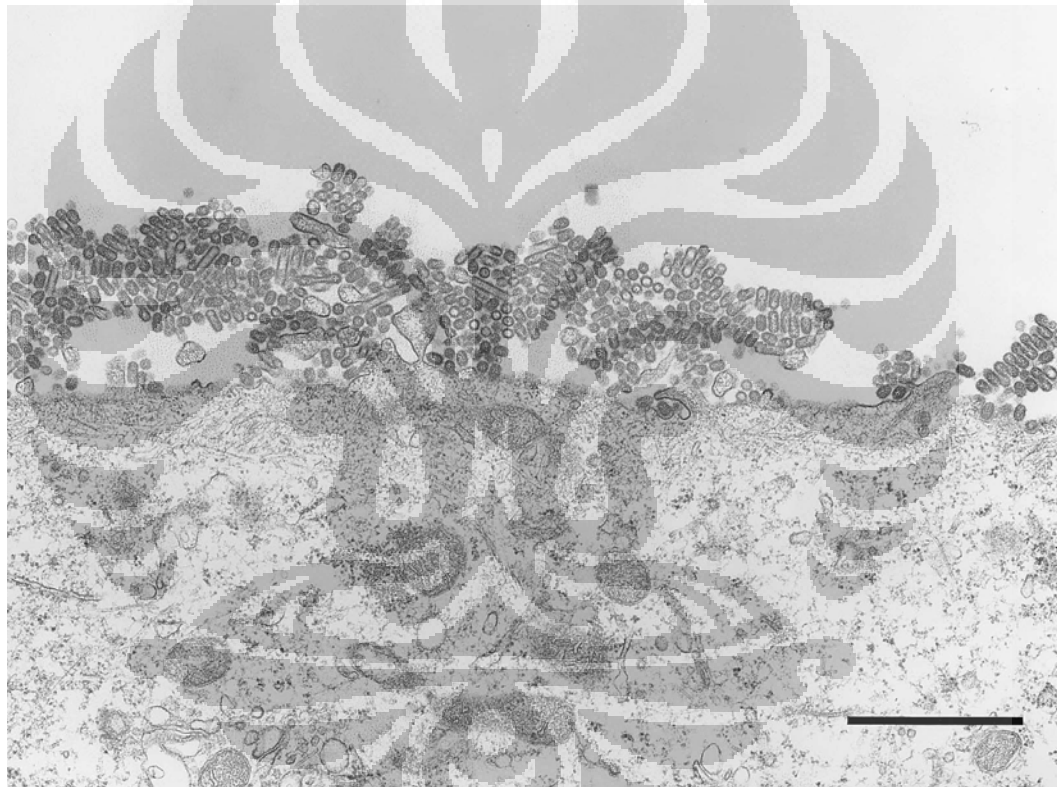
Nama influenza unggas muncul sebagai sebuah momok menakutkan pertama kali pada pandemik influenza 1918 yang lebih dikenal sebagai flu Spanyol. Sekuen virus diberikan label A/Brevig Mission/1/18. Pada saat itu diketahui bahwa *neuraminidase* virus influenza manusia memiliki kemiripan dengan galur unggas mulai dari sekuen, karakteristik struktur, *active site*, wilayah *glikosilasi*, panjang batang hingga wilayah antigeniknya [4]. Secara filogenetik gen *neuraminidase* tersebut menjadi bentuk peralihan atau perantara antara mamalia dan burung. Sejak itu penelitian influenza mulai mendapat perhatian penuh dari ilmuwan di segenap penjuru dunia.

Virus influenza A manusia, yang awalnya diketahui (tahun 1973-1981) bahwa N2 memiliki spesifikasi dan mampu membedakan SA yang menempel pada penghubung alpha 2,3 dan alpha 2,6. Namun kemudian pada tahun (1991) penelitian membuktikan adanya *antigenic drift* yang menyebabkan NA dapat meng-*hidrolisis* keduanya [31]. Sehingga virus dapat berpindah antar spesies. *Antigenic drift* itu sendiri merupakan mutasi yang menyebabkan virus memiliki sejumlah asam amino yang berbeda dari virus pendahulunya [32] sehingga mempunyai kemampuan untuk mengelabui antibodi. Hal tersebut dibedakan dengan *antigenic shift* yang merupakan perubahan yang menyebabkan subtipe virus mengalami perubahan [32]. Misalnya, bila pada awalnya subtipe virus tersebut adalah H5N2, maka setelah terjadi *antigenic shift* virus tersebut bisa saja setelah proses replikasi menjadi H3N2 atau H5N1. Umumnya *antigenic shift* terjadi bila dua subtipe virus menginfeksi hewan perantara. Modifikasi terjadi di sel inang hewan perantara yang terinfeksi menyebabkan perubahan subtipe dan bertambahnya kemampuan virus dalam mengelabui antibodi.

*Antigenic drift* dan *antigenic shift* diyakini telah menjadikan virus influenza unggas berevolusi dari tingkatan pathogenisitas rendah menjadi pathogenisitas tinggi. Keduanya merupakan mekanisme yang menyebabkan

terjadinya keragaman populasi virus. Juga menjadi sasaran utama penelitian khususnya dalam penelitian virus influenza mengingat kedua mekanisme tersebut menyebabkan virus memiliki kemampuan merubah diri dan beradaptasi sehingga mempunyai kemungkinan untuk menginfeksi spesies inang baru.

Pada penelitian ini, disimulasikan kemampuan enzim *sialidase* atau yang dikenal sebagai *neuraminidase* dalam memotong *sialic acid* yang menghubungkan virion yang matang dan siap lepas dari sel inang untuk dibandingkan antara influenza unggas berpathogenisitas rendah (LPAI) dengan berpathogenisitas tinggi (HPAI).



Gambar 3.1: Virion akan tetap menggantung pada Sialic Acid di Sel Inang bila Neuraminidase tidak melakukan perannya dalam Siklus Hidup Virus [33]

Antara *neuraminidase* LPAI dan HPAI hanya memiliki perbedaan residu 9% dan memiliki panjang batang yang sama untuk mengurangi kompleksitas analisa mengingat panjang batang memiliki pengaruh terhadap aktivitas katalitik *neuraminidase*. Sehingga penelitian dapat lebih terfokus pada wilayah katalitik/wilayah aktif dari *neuraminidase* virus influenza unggas.

Penelitian ini bertujuan memberikan informasi tambahan dalam membandingkan NA HPAI dengan LPAI dengan membuat model strukturnya di komputer dengan permodelan homologi. Mengingat wilayah aktif dari NA virus influenza memiliki kemiripan, maka ini akan membuka peluang terjadinya pembuatan obat inhibitor NA dengan spektrum sub tipe yang lebih lebar [29] dan menjadi penelitian pendukung hasil uji laboratorium. Berikut akan dibahas sejumlah perkembangan terakhir tentang *neuraminidase*.

### 3.1 Studi Pathogenisitas berdasarkan *Neuraminidase*

#### 3.1.1 Penelitian *In Vivo* dan *In Vitro*

Pelepasan virion dari sel inang sangat diperlukan sebagai langkah akhir proses multiplikasi dan replikasi virus dalam sel inang yang telah terinfeksi. Pelepasan virion dapat menentukan pathogenesis virus [34]. Proses pelepasan virion ini merupakan langkah terakhir dalam proses replikasi virus di dalam sel inang. Oleh karena itu proses ini dipandang sebagai proses penting yang mampu “menyelamatkan” virion yang telah matang dan baru bermunculan di tepian sel inang dengan *hemagglutinin* yang masih menempel pada *sialic acid*.

Penelitian tentang tingkat pathogenisitas berdasarkan *neuraminidase* masih terhitung jarang. Hal ini dikarenakan bukan *neuraminidase* yang diketahui menjadi penyebab utama tingkat pathogenisitas virus. Melainkan *hemagglutinin* lah yang dipercaya menjadi faktor penentu berdasarkan kemampuannya mengenali dan mengikat reseptor sel inang yang akan diinfeksi. Walau begitu, ada sejumlah penelitian yang menyebutkan bahwa baik *hemagglutinin* dan *neuraminidase* mempunyai peran yang seimbang dalam mengefisienkan proses replikasi virus [35,36,37] yang berarti sama-sama memiliki peran tersendiri dalam menentukan pathogenisitas virus yang tak bisa diabaikan begitu saja.

Dalam suatu percobaan [38] dengan menggunakan 24 (11 di antaranya pathogen terhadap ayam dewasa) virus yang diisolasi, diketahui tidak hanya *hemagglutinin* yang menjadi penentu pathogenisitas virus. Melainkan seluruh gen virus berperan dalam menentukan pathogenisitas. Dua dari 24 virus yang diuji menunjukkan penyebaran virus dalam ayam yang selamat sangat lambat sehingga

ayam mampu memproduksi antibodi sebelum *hemagglutinin* dari virion menempel di sel inang yang lain. Hal tersebut menunjukkan aktivitas *neuraminidase* kedua virus yang lebih lemah dibanding aktivitas *neuraminidase* virus isolasi lainnya.

### **3.1.1.1 *Neuraminidase* meningkatkan kemampuan menginfeksi virus**

Pada tahun 2009, terdapat sebuah penelitian untuk mengkarakterisasi tingkat pathogenisitas virus influenza berdasarkan sejumlah hal. Termasuk di antaranya berdasarkan kemampuan virus bertransmisi menggunakan ayam, kelinci dan tikus [39]. Eksperimen pada ayam *white leghorn* berusia 5 minggu yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok 10 ekor dilakukan untuk mengetahui *Intravenous Pathogenicity Index* (IVPI)-nya. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa kelima virus yang disuntikkan termasuk golongan yang sangat pathogen dan membunuh seluruh ayam dalam waktu 18-31 jam dengan IVPI berkisar antara 2,93-3.

Eksperimen pada tikus berusia 8 minggu dilakukan dengan membagi menjadi 5 kelompok dan satu kelompoknya diisi 20 ekor tikus. Setelah satu *day post inoculation* (dpi), dua tikus dikontakkan secara langsung dengan tikus-tikus yang telah diinfeksi terlebih dahulu. Dimulai dari 2 dpi, tiap hari diambil 2 tikus diambil hingga 10 dpi untuk dilihat keberadaan virus hasil replikasi di berbagai organ. Sisanya dibiarkan untuk dilihat penurunan berat badan dan mortalitasnya sebagai akibat langsung dari keberadaan virus influenza. Hasilnya, hanya satu kelompok tikus saja yang mengalami penurunan berat badan sejak 3 dpi dan kematian dengan mortalitas 65% pada 14 dpi. Waktu kematian rata-rata (*Mean Death Time, MDT*) sebesar 7,5 hari dan pada kelompok tersebut virus berhasil diisolasi ulang hanya pada otak dan paru-paru saja. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada tikus hanya 1 saja dari kelima virus yang sangat pathogen berdasarkan kemampuannya bertransmisi.

Pada kelinci hanya diuji dua virus saja (salah satunya merupakan virus yang sangat pathogen pada tikus) yang disuntikkan pada 17 kelinci pada masing-masing grup. Untuk menentukan transmisibilitas virus, 5 di antaranya diberikan larutan garam di masing-masing grup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus

mulai merontokkan dirinya di rongga hidung pada 3 dpi dan berhenti pada 10 dpi. Siklus perontokkan virus yang sangat pathogen pada tikus terjadi dalam 7 hari. Satu hari lebih cepat dibanding virus satunya lagi. Virus juga diketahui kemudian hanya ditemukan pada saluran pernapasan atas saja.

Dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa *neuraminidase* juga memiliki peran khusus dalam menentukan pathogenisitas. Pendekatan yang dilakukan dengan melihat frekuensi dan jumlah virion yang dirontokkan dari sel inang dapat menjadi acuan bahwa aktivitas *neuraminidase* pada virus HPAI sangatlah tinggi. Sejumlah penelitian [35,40-45] turut memberikan fakta bahwa pathogenisitas virus influenza unggas memang juga disebabkan oleh kemampuan katalitik/aktivitas enzimatis *neuraminidase* dalam merontokkan virion dari tepian sel inang.

### 3.1.1.2 Pathogenisitas virus dipengaruhi oleh panjang *neuraminidase*

Pada tahun 2009, dua buah penelitian terakhir [46,47] tentang *neuraminidase* dan pathogenisitas memberikan tambahan informasi bahwa *hemagglutinin* tidak sendirian dalam menentukan sangat pathogenik atau tidaknya suatu virus. Melalui perbandingan sekuen dan uji laboratorium berhasil dibuktikan bahwa panjang dan pendeknya batang *neuraminidase* mempengaruhi kecepatan reaksi (aktivitas katalitik tertinggi mencapai lima kali lipat) [47]. Dengan kata lain juga semakin mempercepat terjadinya perontokan virion di saluran pernapasan.

36 <sup>th</sup> → Stalk region ← 79 <sup>th</sup>	Comment	Recombinant virus with different stalk-motif
HSIQTGNQNHGICNQGSITY-----KVVAGQD	A/WSN/33/H1N1	rWSN-like
HSIQTGSQNHGICNQNLITYKNSTWV-----KD	A/Puerto Rico/8/34/H1N1	rPR/8-like
HI IQTWHPNQPEPCNQSI-----NFYTEQA	A/Hong Kong/156/97/H5N1	rH5N1/97-like
HSIQTGNQYQPEPCNQSI-----TEQA	A/Ck/Italy/1067/99/H7N1	rH7N1/99-like
HSIQTGNQHQAEPCNQSIITYENNTWVNQTYVNIISNTNFLTEKA	A/Gs/Gd/1/96/H5N1	rH5N1/96-like
HSIQTGNQHQAEPCNQSI-----QTYVNIISNTNFLTEKA	10-amino-acid insertion in NA-wt	rSA10
HSIQTGNQHQAEPCNQSI-----ISNTNFLTEKA	A/ck/Hubei/327/2004/H5N1	rNA-wt
HSIQTGNQ-----FLTEKA	10-amino-acid deletion in NA-wt	rSD10
HS-----KA	20-amino-acid deletion in NA-wt	rSD20

Gambar 3.2: Contoh Wilayah Batang yang Mengalami Pemendekan pada Virus Influenza Unggas yang Lebih Pathogenik [46]

Panjang dan pendek batang *neuraminidase* tersebut juga telah diketahui sebagai akibat delesi, insersi dan mutasi pada wilayah tertentu pada sekuen yang disebut wilayah batang. Virus influenza unggas yang diisolasi dari tahun 2000-2007, diketahui mengalami peningkatan persentase dari tahun ke tahun dalam hal pemendekan yang men-delesi 20 asam amino yang berada pada residu 49-68 (untuk N1) yang dikenal sebagai motif batang istimewa. Peningkatan (pada tahun 2000 hanya 15,8% yang kemudian menjadi 100% pada tahun 2007) tersebut seiring dengan semakin luasnya penyebaran virus influenza unggas dari tahun ke tahun. Uji laboratorium dari sejumlah virus dari 1996 hingga 2007 juga turut memberikan informasi tambahan mengenai pengaruh wilayah batang istimewa. Pada tikus dan ayam keberadaan motif batang istimewa pada *neuraminidase* terbukti mempengaruhi tingkat bahaya dan pathogenisitas virus influenza unggas [46].



Gambar 3.3: Wilayah Batang Istimewa yang Kehilangan 20 Asam Amino [46]

### 3.1.2 Penelitian *In Silico*

Pada penelitian *in vivo* dan *in vitro*, kita dapat menentukan aktivitas katalitik enzim *neuraminidase* berdasarkan kecepatan reaksinya dan okupansinya pada organ-organ ketika dalam masa mengguguran diri dari sel-sel inang. Sedangkan pada *in silico*, kita dapat menentukan kekuatan enzimatik *neuraminidase* berdasarkan kemampuannya mengikat substrat [48,49]. Hal ini didasarkan pada adanya hubungan langsung antara peristiwa enzimatik dengan interaksi *ligand* dan substrat sebagai sebuah kompleks [50,51]. Dengan analisa struktur memungkinkan peneliti untuk menjelaskan dengan lebih spesifik keberadaan residu-residu yang menjadi pemeran utama dalam mengkatalisis substrat.

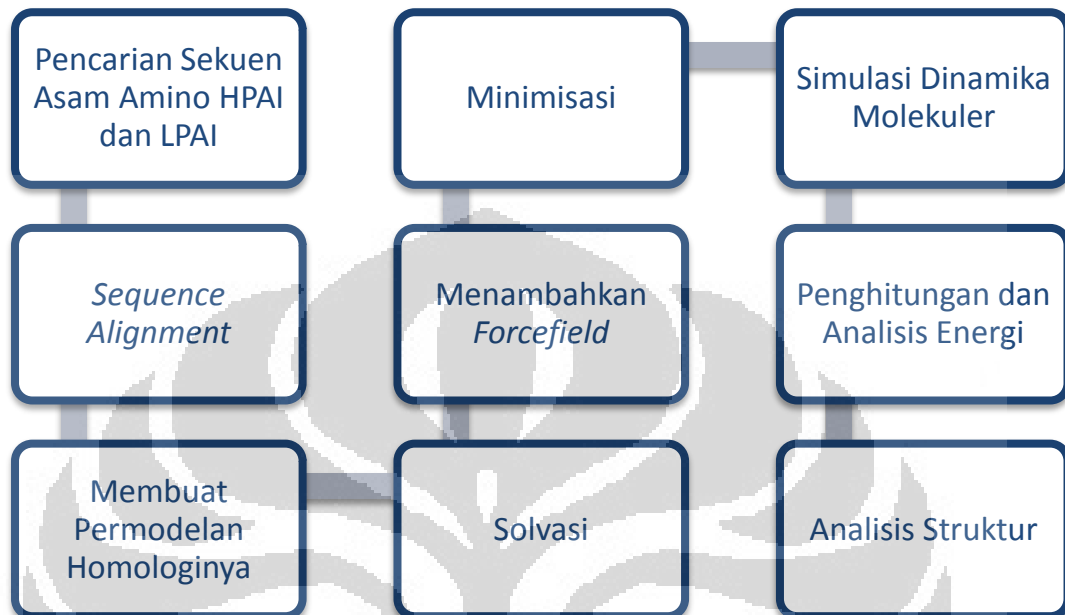
Pada *neuraminidase* influenza, sebagian residu yang berada pada wilayah aktif berinteraksi secara langsung (residu fungsional). Sebagian yang lain berfungsi sebagai pendukung interaksi residu fungsional dengan substrat (residu

*framework*) [52]. Sejumlah penelitian bahkan telah berhasil memetakan letak mutasi residu tertentu yang menyebabkan resistensi virus terhadap obat inhibitor *neuraminidase* [53, 1] berdasarkan analisis struktural yang dilakukan *in silico*.

Sampai saat ini belum ada penelitian yang memeriksa pengaruh enzimatik *neuraminidase* terhadap pathogenisitas antara HPAI dengan LPAI. Pada *neuraminidase*, arah penelitian *in silico* lebih kepada kemampuan pengikatan NA dengan inhibitor serta kajian resistansinya. Pada *hemagglutinin* virus influenza, terdapat dua penelitian [50,51] yang berusaha membandingkan interaksi pemotongan *cleavage site* dari *hemagglutinin* HPAI dan LPAI dengan bantuan *purin* dan *trypsin*. Dalam penelitian tersebut dikatakan bahwa pada HPAI, kedua enzim dapat berikatan. Sedangkan pada LPAI hanya *trypsin* yang membentuk ikatan dengan substratnya. Dalam penelitian tersebut juga dikatakan bahwa energi bebas ikatan *furin* dengan *cleavage site* LPAI sebesar -78,35 kcal/mol disebut memiliki ikatan lemah dan *cleavage site* tidak dapat menjadi substrat spesifik dari *furin*.



## BAB IV METODE



Gambar 4.1 Bagan Penelitian Simulasi Dinamika Molekuler

Secara keseluruhan, metode penelitian yang digunakan adalah metode medan gaya atau yang sering disebut juga mekanika molekuler. Penghitungan mekanika molekuler mengabaikan pergerakan elektron dan mengkalkulasi energi sistem sebagai fungsi posisi inti atom saja. Meskipun begitu, metode ini dapat memberikan informasi seakurat penghitungan mekanika kuantum meskipun tanpa memperhitungkan distribusi elektron dalam molekul.

### 4.1 *Sequence Alignment*

*Alignment* merupakan prosedur perbandingan kesamaan dua (*pair-wise alignment*) atau lebih (*multiple alignment*) sekuen asam amino untuk mengidentifikasi similaritas sekuen yang mempunyai hubungan langsung dengan

Substitusi: ACGA → AGGA  
Inseri: ACGA → ACCGGAGA  
Delesi: ACGGAGA → AGA  
Transposisi: ACGGAGA → AAGCGGA  
Inversi: ACGGAGA → ACTCCGA

Gambar 4.2: Tipe pengeditan sekuen yang mungkin terjadi pada DNA

bentuk struktur dan fungsi dengan mencari urutan karakter serta polanya. Sekuen-sekuen di-align dengan meletakkannya dalam barisan masing-masing. Karakter yang identik dan similar ditempatkan dalam kolom yang sama. Kemudian karakter yang tidak identik akan ditempatkan di kolom yang sama dengan warna berbeda dan dianggap terjadi mutasi/substitusi atau diberikan jarak dan dapat dianggap terjadi insersi ataupun delesi.

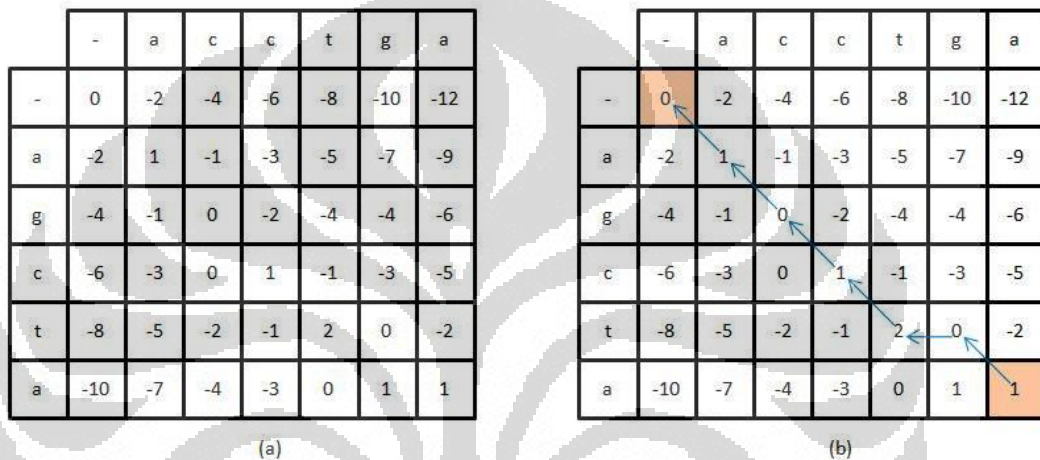
Dalam perangkat lunak *Discovery Studio*, *alignment* terbagi menjadi tiga mode utama. Mode pertama adalah *Align a set of sequences* yang digunakan untuk meng-align multipel sekuen. Mode kedua adalah *Align a set of sequences to an existing alignment* untuk membandingkan sekuen yang ingin diketahui dengan multipel sekuen yang sudah di-align. Mode yang ketiga adalah *Align two existing alignments* yang membandingkan dua sekuen yang ingin diketahui keidentikan dan similaritasnya. Dalam penelitian ini dipakai mode ketiga saja.

#### 4.1.1 *Pairwise Sequence Alignment*

*Pairwise Sequence Alignment* dipakai dalam membandingkan dua sekuen maupun lebih. Ada sejumlah cara dan algoritma dalam melakukan proses *alignment* tersebut. Dalam program *Clustal W* yang terintegrasi dalam perangkat lunak *Discovery Studio* diketahui memakai algoritma *dynamic programming* [54]. Nilai untuk *alignment* antara  $x_1...x_i$  (sekuen pertama) dan  $y_1...y_i$  (sekuen kedua) diberikan oleh:

$$F(i, j) = \max \left\{ \begin{array}{l} \frac{F(i-1, j-1)+1, x_i = y_j \text{ (sama hurufnya)}}{F(i-1, j-1)-1, x_i \neq y_j \text{ (mutasi/substitusi)}} \\ \frac{F(i-1, j)-2, \text{ align } x_i \text{ dengan gap}}{F(i, j-1)-2, \text{ align } y_j \text{ dengan gap}} \end{array} \right\} \quad (4.1)$$

Dengan memberikan nilai awal  $F(0,0)=0$ ,  $F(0,j)=jd$ ,  $F(i,0)=id$ . Maka akan terbentuk matriks seperti pada gambar 4.2(a). Kemudian, setelah matriks terbentuk, dilakukan lacak balik ke tiga arah dari koordinat (i,j) ke koordinat (i-1,j-1), (i,j-1), (i-1,j) dengan mencari nilai yang lebih positif (lihat gambar 4.2(b)):



Gambar 4.3: (a) Contoh matriks yang dihasilkan algoritma dynamic programming; (b) Contoh sistem lacak balik dalam menentukan urutan sekuen dan penentuan penyertaan gap dalam alignment.

## 4.2 Permodelan Homologi

Permodelan homologi adalah permodelan 3D struktur yang dilakukan dengan mencari similaritas urutan sekuennya. Perangkat lunak yang memiliki metode ini mempunyai *database* sekuennya sendiri yang kemudian akan dibandingkan dengan sekuen molekul yang ingin dimodelkan. Apabila sekuen yang diinginkan terdapat dalam *database*, maka sekuen *template* tersebut akan dijadikan *backbone* dari struktur yang dimodelkan dan kemudian dimutasikan.

Permodelan homologi ini merupakan metode yang cukup baik digunakan untuk memprediksi struktur dengan asumsi protein yang ingin dibentuk memiliki kemiripan dengan protein referensi (*template*) homolognya di atas 70%[55]. Hal tersebut dikarenakan untuk membentuk molekul yang akurat, harus dibentuk

terlebih dahulu *backbone* dari molekul yang hanya bisa didasarkan pada persentase kemiripan yang cukup tinggi.

### 4.3 CHARMM Forcefield

CHARMM adalah singkatan dari *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics* dan merupakan nama medan gaya yang dapat diaplikasikan pada permodelan molekuler di komputer. CHARMM menggunakan fungsi energi yang fleksibel dan komprehensif yang merupakan sumasi dari beberapa energi. Fungsi energi didasarkan pada koordinat internal dan interaksi tanpa ikatan (seperti elektrostatik dan interaksi van der Waals) [56]. Energi total sesuai dengan persamaan berikut:

$$E_{pot} = E_{bond} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{oop} + E_{elec} + E_{vdw} \quad (4.2)$$

$$= \sum k_b (r - r_o)^2 + \sum K_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum (|k_\phi| - k_\phi \cos(n\phi)) + \sum k_x (\chi - \chi_o)^2 + \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon 4\pi \epsilon_o r_{ij}} + \sum \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) sw(r_{ij}^2, r_{on}^2, r_{off}^2) \quad (4.3)$$

dengan:  $E_{pot}$  = energi potensial total

$E_{bond}$  = energi peregangan ikatan (*bond stretching*)

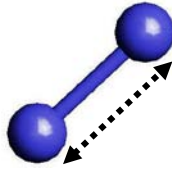
$E_{angle}$  = energi pembengkokan sudut (*angle bending*)

$E_{torsion}$  = energi torsional

$E_{oop}$  = energi *out of plane*

$E_{elec}$  = energi elektrostatik

$E_{vdw}$  = energi van der Waals



Gambar 4.4: Peregangan Ikatan

*Peregangan Ikatan.* Gaya tolak antara 2 atom yang berikatan sangatlah kuat dan akan menyebabkan atom-atom saling menjauh untuk mencari nilai kesetimbangannya untuk mencari geometri yang optimum hingga meminimalkan energinya. Besar energinya dapat diturunkan dari persamaan Hukum Hooke:

$$E_{bond} = \frac{k}{2}(l - l_o)^2 \quad (4.4)$$

dengan:  $k$  = konstanta peregangan ikatan

$l$  = jarak ikatan

$l_o$  = jarak ikatan referensi



Gambar 4.5: Pembengkokan Sudut

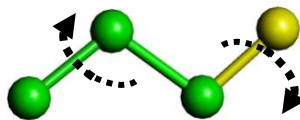
*Pembengkokan Sudut.* Diakibatkan oleh adanya tiga atom yang memiliki polaritas tertentu berikatan sehingga mengakibatkan terjadinya pembengkokan. Deviasi pembengkokan sudut akan menyebabkan perubahan energi yang cukup signifikan. Energi pembengkokan sudut ini juga dihitung menggunakan persamaan Hukum Hooke:

$$E_{angle} = \frac{k}{2}(\theta - \theta_o)^2 \quad (4.5)$$

dengan:  $k$  = konstanta peregangan ikatan

$\theta$  = sudut ikatan

$\theta_o$  = sudut ikatan referensi



Gambar 4.6: Sudut Torsional

*Sudut Torsional.* Kontribusinya disebabkan oleh empat atom yang berikatan. Potensial torsi diekspresikan dengan persamaan:

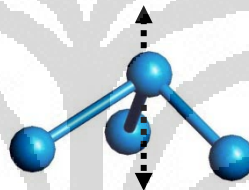
$$E_{torsion} = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (4.6)$$

dengan:  $E_{torsion}$  = energi torsional

$V_n$  = potensial penghalang

$\gamma$  = faktor fase

$\omega$  = sudut torsi



Gambar 4.7: Out-of-plane atau Improper Torsion

*Pembengkokan Out-of-plane.* Dibuat untuk menyesuaikan sudut pembengkokan yang terjadi dengan sudut referensi. Disebut juga torsi yang tidak seharusnya atau *improper torsion*. Energinya dihitung dengan persamaan:

$$E_{oop} = k(1 - \cos 2\omega) \quad (4.7)$$

*Elektrostatik.* Pada metode mekanika kuantum, kontribusi elektrostatik mendetail hingga penghitungan distribusi elektron. Metode yang kita pakai hanya menghitung berdasarkan muatan atom. Interaksinya dikalkulasi dengan persamaan Hukum Coulomb:

$$E_{elec} = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4.8)$$

dengan:  $E_{elec}$  = energi elektrostatik

$N_A$  dan  $N_B$  = jumlah muatan titik

$q$  = muatan listrik

$r$  = jarak antara dua muatan

$\epsilon_0$  = permisivitas elektrik

*Interaksi van der Waals*. Interaksi ini berkontribusi dalam memberikan jarak minimum yang mungkin dimiliki antara dua atom. Diberikan dengan persamaan Lennard-Jones:

$$E_{vdW} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (4.9)$$

dengan:  $\epsilon$  = kedalaman sumur potensial

$\sigma$  = jarak ketika energinya nol

$r$  = jarak ketika energinya minimum

#### 4.4 Minimisasi Energi

Permodelan molekuler yang dilakukan dirancang agar molekul mempunyai nilai energi minimum sebelum disimulasikan. Energi minimum berhubungan langsung dengan kestabilan suatu sistem. Dalam meminimalkan energinya, atom-atom pada suatu molekul terus mengubah posisinya sehingga dapat mencapai gradien energi yang diinginkan atau disebut juga optimisasi geometri.

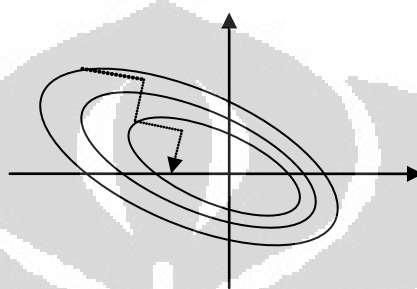
Energi suatu sistem diminimisasi dengan algoritma yang dinamakan algoritma minimisasi. Meminimisasi energi sistem dilakukan dengan menganggap energi sebagai suatu fungsi  $f$  yang bergantung terhadap satu atau lebih variabel independen  $x_1, x_2, \dots, x_i$ . Pada nilai minimumnya, turunan pertama fungsi tersebut haruslah bernilai nol dan turunan keduanya positif:

$$\frac{\delta f}{\delta x_i} = 0; \frac{\delta^2 f}{\delta x_i^2} > 0 \quad (4.10)$$

Pada penelitian ini, minimisasi energi dilakukan dalam dua tahap. Yakni, *steepest descent* hingga gradien energinya mencapai 0,5 kcal/mol dan *conjugate*

*gradient* hingga gradien energi mencapai 0,1 kcal/mol. Pembagian tahap ini disebabkan oleh adanya sejumlah faktor. Mulai dari waktu yang diperlukan CPU mengolah data posisi molekul, jumlah iterasinya hingga untuk menghindari interaksi antar atom yang tidak diinginkan. Keduanya hanya menggunakan derivasi orde satu.

#### 4.4.1. *Steepest Descent*



Gambar 4.8: Minimisasi Energi pada Metode Steepest Descent

Gradien energi, atau turunan pertama dari persamaan energi, dapat mengindikasikan posisi untuk mencapai energi minimum suatu molekul. Besarnya sendiri merupakan tingkat kecuraman kemiringan lokal pada suatu wilayah tertentu. *Steepest descent* memanfaatkan prinsip ini untuk melakukan minimisasi awal dengan gradien yang tidak terlalu curam untuk menghemat waktu pengolahan molekul.

Terdapat lima langkah utama dalam pengolahan data dengan metode steepest descent. Yang pertama adalah menentukan nilai  $x_0$ , set penghitung iterasi  $k = 0$  dan menentukan parameter konvergensi. Kedua mengkalkulasi  $f(x)$  pada titik  $x^k$  sebagai  $c^k = \nabla f(x^k)$ .

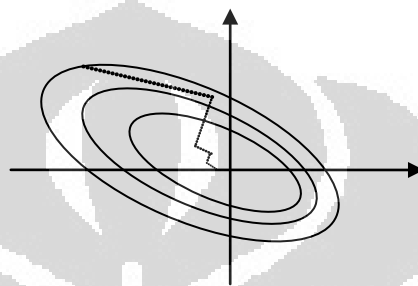
$$\nabla f = \left[ \frac{\partial f}{\partial x_1} \frac{\partial f}{\partial x_2} \dots \dots \frac{\partial f}{\partial x_n} \right]^T = c \quad ; \text{ dengan } \|c\| = \sqrt{c^T c}. \quad (4.11)$$

Jika  $\|c\|$  lebih kecil dari parameter konvergensi iterasi menghentikan prosesnya dan menentukan  $x^k$  tersebut sebagai titik dengan energi minimum pada konvergensi yang diinginkan. Jika tidak maka langkah selanjutnya adalah mencari arah pada titik tersebut dengan menentukan  $d^k = -c^k$ . Kemudian ke empat



menghitung fungsi energi untuk diminimalkan dengan bantuan parameter *step size*  $\alpha^k$  yang diberikan oleh persamaan  $\alpha^k = \frac{(d^k)^T c^k}{(d^k)^T \cdot Q \cdot d^k}$ . Langkah selanjutnya adalah memberikan posisi  $x^{k+1} = x^k + \alpha^k d^k$  dan menetapkan  $k=k+1$  dan kembali ke langkah 2 hingga fungsi energi mencapai minimum.

#### 4.4.2 Conjugate Gradient



Gambar 4.9: Minimisasi Energi pada Metode Conjugate Gradient

Sama seperti *steepest descent*, *conjugate gradient* hanya menghitung hingga turunan pertamanya saja. Hanya pada *conjugate gradient*, dalam mencari arah pergerakan atom selanjutnya, digunakan pula gradien negatif pada titik tersebut. Dengan kata lain, langkah awal metode ini sama seperti langkah awal pada metode *steepest descent*, namun langkah selanjutnya akan dicari posisi tidak hanya mengikuti gradien positifnya, melainkan juga ke arah gradien sebelumnya  $d^{k+1} = -c^{k+1} + \beta^k d^k$ ; dengan nilai  $\beta^k$  yang dirumuskan Polak-Ribiere  $\beta_k = \frac{c_{k+1}^T \cdot (c_{k+1}^T - c_k^T)}{c_k^T}$ .

Hal ini akan memberikan informasi yang lebih pasti namun memakan waktu penghitungan lebih lama. Oleh karena itu, untuk meminimisasi energi tidak dilakukan langsung dengan metode *conjugate gradient*. Melainkan menggunakan *steepest descent* terlebih dahulu dengan gradien yang lebih besar dari gradient energi yang diaplikasikan pada metode *conjugate gradient*.

## 4.5 Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan dengan menggunakan Hukum Newton tentang Gerak. Yakni bagaimana posisi suatu atom dipengaruhi oleh waktu. Hukum Gerak Newton dapat dinyatakan:

1. Suatu benda akan tetap bergerak pada suatu gerak lurus dengan kecepatan konstan bila tidak ada gaya luar yang mempengaruhi.
2. Gaya sebanding dengan laju perubahan momentum.
3. Aksi sebanding dengan reaksi dalam arah yang berlawanan.

Persamaan yang dipakai untuk melihat lintasan dalam simulasi umumnya adalah persamaan diferensial Newton untuk hukum yang kedua [57]:

$$\frac{F_{x_i}}{m_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} \quad (4.12)$$

dengan: F = gaya atom

m = massa atom

x = posisi/koordinat atom

t = waktu

Dalam simulasi dinamika molekuler, dimodelkan dengan menaikkan suhunya sehingga menyerupai suhu ruangan (300 K). Hal ini dilakukan dengan argumen bahwa referensi uji laboratorium yang dilakukan pada suhu ruangan. Energi kinetik yang berkontribusi pada perubahan energi total akibat perubahan temperatur diberikan oleh persamaan berikut:

$$E_k = \sum_{i=1}^N \frac{|p_{i}|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_C) \quad (4.13)$$

dengan:  $E_k$  = energi kinetik

$3N - N_C$  = jumlah derajat kebebasan

$k_B$  = konstanta Boltzmann

#### 4.6 Penghitungan Energi Bebas Ikatan

Dalam memperkirakan energi bebas ikatan, dilakukan penghitungan energi kompleks, ligand dan reseptor [58]. Energi kompleks, ligand dan reseptor dihitung menggunakan persamaan berikut ini:

$$\bar{G} = \bar{E}_{MM} + \bar{G}_{solvation} - TS \quad (4.14)$$

$\bar{G}$  adalah energi bebas Gibbs rata-rata,  $\bar{G}_{solvation}$  adalah energi bebas elektrostatis dan nonpolar dari solvasi implicit,  $TS$  merupakan kontribusi entropi terhadap temperatur sistem dan  $\bar{E}_{MM}$  yang merupakan energi medan gaya/mekanik molekuler tidak lain merupakan energi potensial:

$$\bar{E}_{MM} = E_{pot} = E_{bond} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{oop} + E_{elec} + E_{vdW} \quad (4.15)$$

Hubungan ketiga energi dipenuhi oleh persamaan:

$$\Delta G_{ikatan} = \bar{G}_{kompleks} - (\bar{G}_{ligand} + \bar{G}_{reseptor}) \quad (4.16)$$

## BAB V

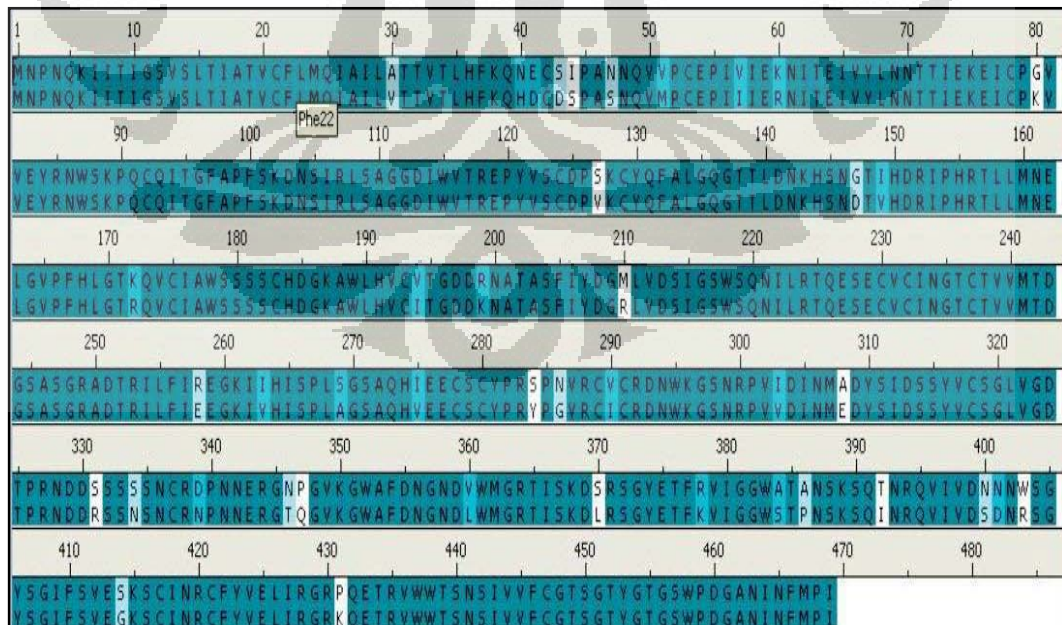
### PENGOLAHAN DATA, HASIL & DISKUSI

#### 5.1 Pengolahan Data

##### 5.1.1 Analisis Sekuen Asam Amino HPAI dan LPAI

Data LPAI yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari NCBI[59] dan terdiri dari data kode genetik basa DNA yang disertakan pula susunan asam aminonya. *Neuraminidase* virus influenza LPAI yang digunakan berasal dari virus A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 yang merupakan H5N2[60]. Sedangkan *neuraminidase* virus influenza HPAI yang digunakan berasal dari virus A/N2/Tokyo/3/67[61] yang merupakan H3N2[62]. Sehingga dalam penelitian ini hanya LPAI saja yang dibuat permodelan homologinya karena *template* yang digunakan merupakan virus HPAI yang digunakan dalam penelitian ini.

Melalui proses *sequence alignment* diketahui antara virus HPAI dan LPAI memiliki kemiripan struktur 91%. Tingkat kemiripan struktur yang tinggi sesuai dengan fakta bahwa kedua *neuraminidase* ini masih satu subtipe (yakni N2) meskipun memiliki *hemagglutinin* yang berbeda.



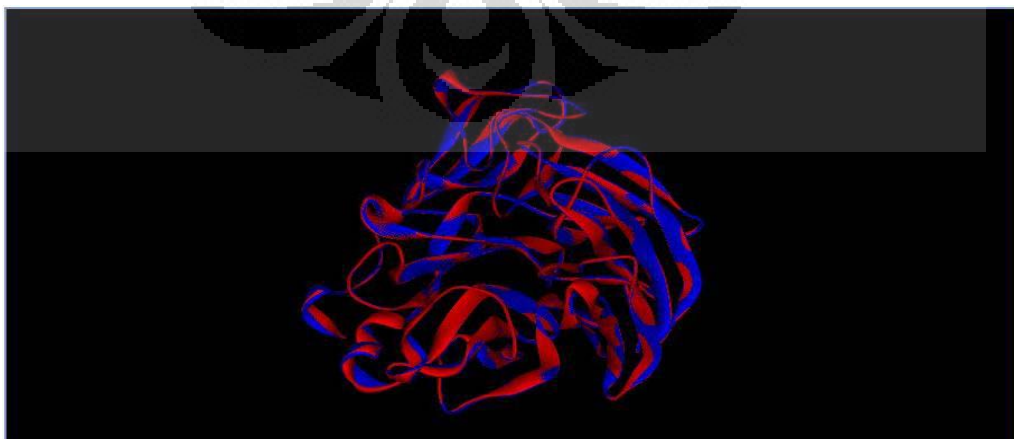
Gambar 5.1 Sequence Alignment LPAI (deret atas) dan HPAI (deret bawah)

Pada gambar 5.1 dapat dilihat hasil *sequence alignment* yang telah dilakukan. Terdapat 42 residu yang berbeda antara data sekuen asam amino LPAI (baris atas) dan HPAI (baris bawah) yang digunakan dalam simulasi dinamika molekuler ini. Mutasi yang dilakukan adalah mutasi LPAI relatif terhadap HPAI yang menjadi *template* terdiri dari V30A, H40N, D41E, D43S, S44I, S47N, M51V, I57V, R60K, K80G, V127S, D147G, V149I, R172K, I194V, K199R, R210M, E258R, V263I, A269S, V275I, Y284S, G286N, I290V, V303I, E308A, R331S, N334S, N339D, T346N, Q347P, L360V, L370S, K378R, S384A, P386S, I392T, S400N, D401N, R403W, G414S dan K431P.

Tidak adanya residu di wilayah aktif yang termutasi menjadi catatan tersendiri bahwa adanya kemungkinan perubahan residu yang berada tidak jauh dan berinteraksi dengan residu di wilayah aktif untuk ikut mempengaruhi kestabilan struktur kompleks dan ikatan enzim-substrat.

### 5.1.2 Permodelan Homologi

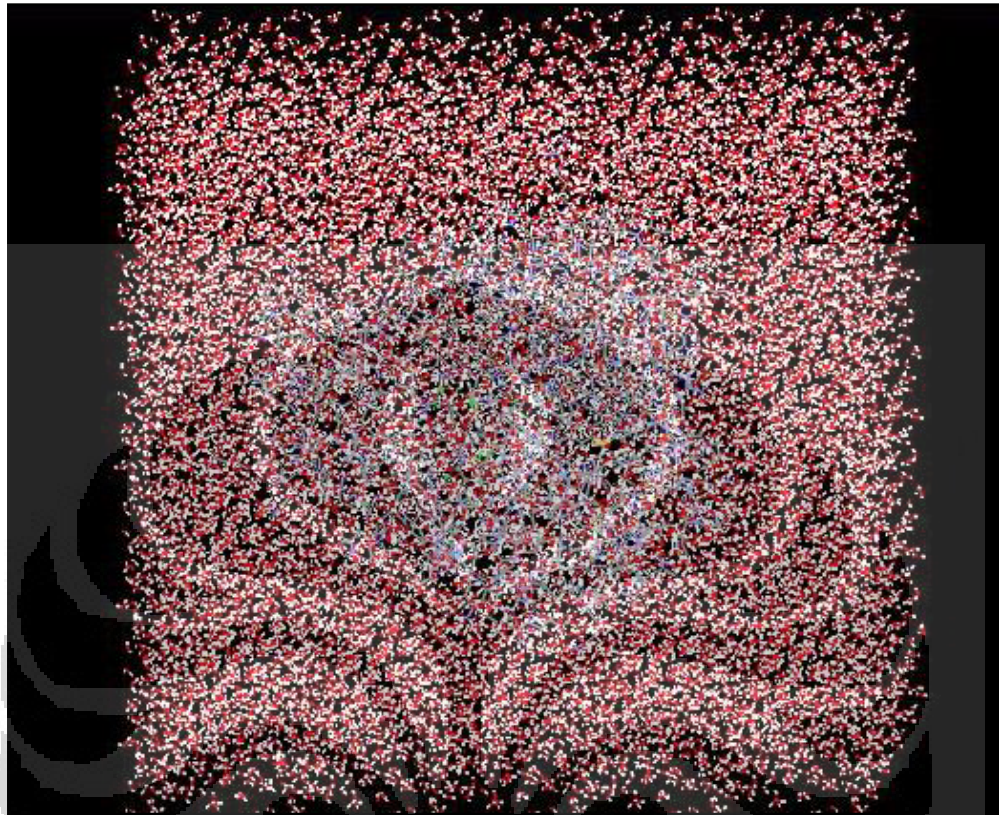
Permodelan homologi dilakukan untuk membuat struktur LPAI dengan *template* HPAI yang didapatkan dari RCSB[63] dengan kode struktur 2BAT. Dalam penelitian ini, *template* yang digunakan hanya mengandung kepala *globular* dari NA saja. Residu 1-81 tidak dilibatkan dalam penelitian. Sehingga permodelan homologi yang dilakukan hanya memutasikan 32 residu yang berada antara 82-469. Permodelan ini berhasil dilakukan dengan baik terbukti dari *fitting backbone* molekul yang serupa seperti yang terlihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Fitting Struktur Backbone Molekul LPAI (warna biru) dan HPAI (warna merah)



### 5.1.3 Penambahan Air (Solvasi) dan Aplikasi Medan Gaya/Mekanika Molekuler



Gambar 5.3 Penambahan Air dalam Permodelan Struktur

Model kepala NA beserta substratnya dimasukkan ke dalam kotak air berukuran  $64 \times 76 \times 80 \text{ \AA}^3$  untuk mengkondisikan semirip mungkin keadaan virus di lingkungan. Kotak air berbentuk *orthorombik* ini memiliki jarak minimum tepi dari kompleks enzim-substrat  $7 \text{ \AA}$  yang merupakan *default parameter* pada perangkat lunak *Discovery Studio*. Keberadaan air secara nyata (*explicit water*) sangat diperlukan dalam simulasi dinamika molekuler menggunakan molekul yang berukuran besar. Dalam melakukan simulasi dinamika molekuler interaksi NA-SA hanya dengan menggunakan komponen energinya tanpa keberadaan air itu sendiri (*implicit water*), SA terlepas dan bergerak menjauhi NA.

### 5.1.4 Minimisasi Energi dan Simulasi Dinamika Molekuler

*Minimisasi Energi.* Minimisasi energi dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama dilakukan menggunakan *steepest descent* dengan toleransi gradien energi

0.5 kcal/mol. Tahap kedua dilakukan menggunakan *conjugate gradient* dengan toleransi gradien energi 0.1 kcal/mol.

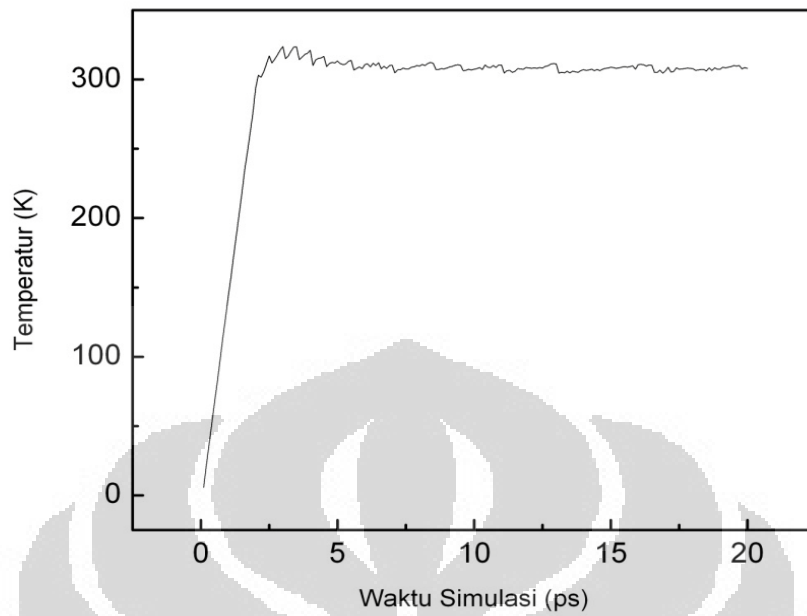
Tabel 5.1: Hasil Penghitungan Energi Potensial Setelah Proses Minimisasi Tahap I dan II

Tahap Minimisasi	HPAI (kcal/mol)	LPAI (kcal/mol)
<i>Steepest Descent</i> (gradien 0,5 kcal/mol)	-721433.36	-607065.72
<i>Conjugate Gradient</i> (gradien 0,1 kcal/mol)	-759646.75	-642144.11

Tabel 5.1 memperlihatkan energi potensial struktur (struktur kompleks NA-SA LPAI dan HPAI) pada dua tahap minimisasi, Terlihat energi potensial akhir yang dimiliki HPAI lebih rendah dibandingkan yang dimiliki LPAI. Hal ini menunjukkan bahwa HPAI memiliki kestabilan struktur yang lebih baik dibandingkan LPAI setelah dilakukan optimisasi geometri.

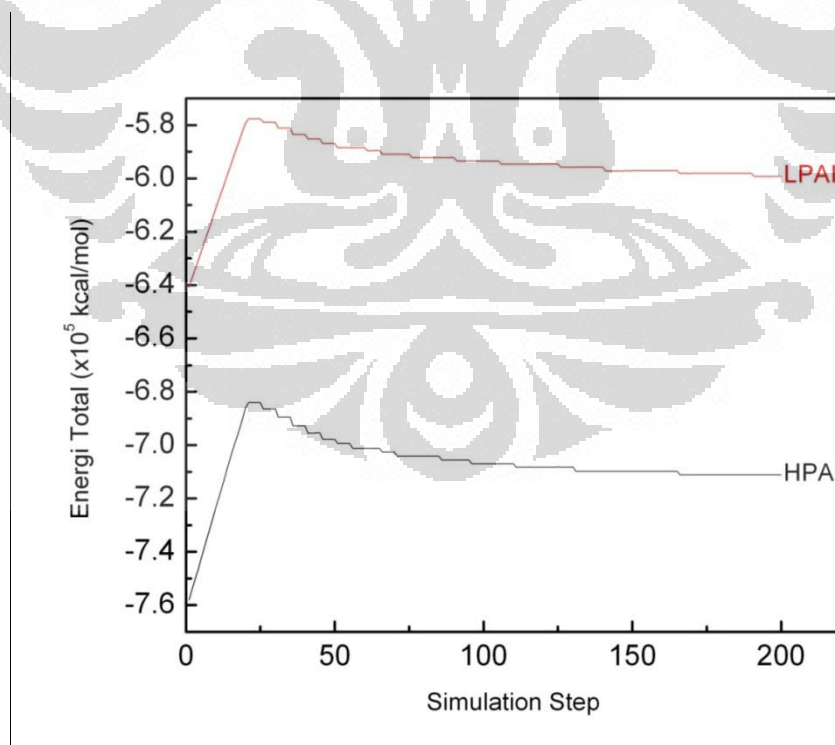
*Simulasi Dinamika Molekuler.* Simulasi dilakukan dengan memanaskan model virus HPAI dan LPAI secara terpisah dalam waktu masing-masing 20 ps. Penentuan tipe simulasi mekanika molekuler dan waktu simulasi ini berdasarkan ukuran molekul yang relatif besar sehingga harus mengalami penyesuaian terhadap kemampuan komputer[49,52,64,65,66]. Sistem mula-mula dipanaskan dari 0 hingga mencapai sekitar 300 K dalam waktu 2 ps. Kemudian proses menaikkan temperatur dihentikan dan membiarkan sistem menstabilkan diri selama sisa waktu 2-20 ps.

Gambar 5.4 memperlihatkan temperatur sebagai fungsi waktu dalam sistem yang disimulasikan. Terlihat dari grafik bahwa setelah 2 ps pertama, usai temperatur mencapai 300 K, temperatur sistem mengalami fluktuasi. Setelah waktu simulasi mencapai 5 ps, baru kemudian temperatur sistem relatif stabil. Hal ini disebabkan molekul-molekul dalam permodelan ini menyimpan energi kinetik yang dipengaruhi oleh temperatur. dan perlahan melepaskan energi tersebut kembali usai proses pemanasan sistem dihentikan.



Gambar 5.4: Grafik Temperatur terhadap Waktu

*Perbandingan Grafik Energi Total selama Simulasi*



Gambar 5.5: Perbandingan grafik Energi Total terhadap Simulation Step model NA-SA HPAI dan LPAI

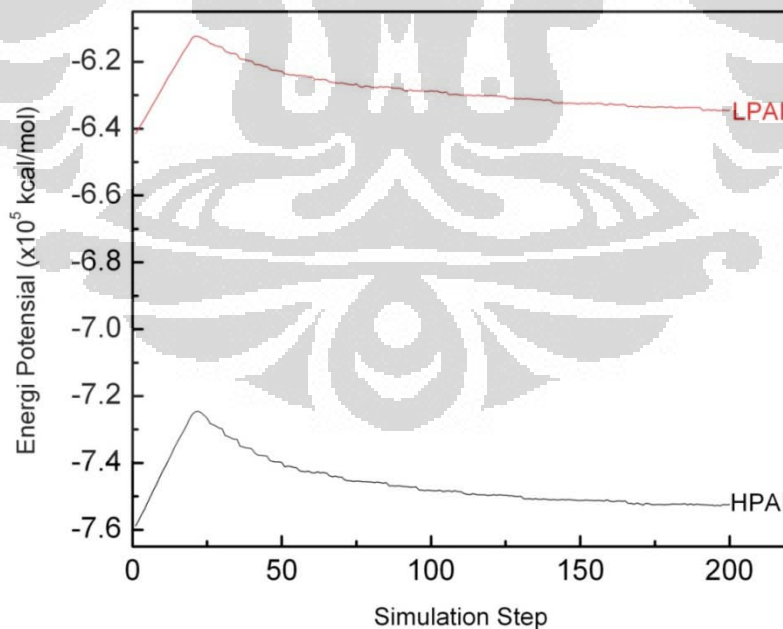


Grafik pada gambar 5.5 memperlihatkan fluktuasi energi total sistem yang disebabkan proses pemanasan yang dilakukan pada simulasi. Terlihat bahwa kedua energi total sistem mengalami kenaikan signifikan selama proses pemanasan pada selang waktu 0-2 ps (*simulation step* 1-20) di awal simulasi. Namun model HPAI lebih cepat menurunkan energi totalnya dibandingkan LPAI di sisa waktu simulasi masing-masing. Sehingga energi total HPAI lebih kecil dibanding LPAI pada akhir simulasi (lihat tabel 5.2).

Tabel 5.2: Energi Total, Potensial dan Kinetik sistem pada akhir simulasi

	HPAI (kcal/mol)	LPAI (kcal/mol)
Energi Total	-711107.21	-599227.56
Energi Potensial	-752454.18	-634487.31
Energi Kinetik	41346.98	35259.76

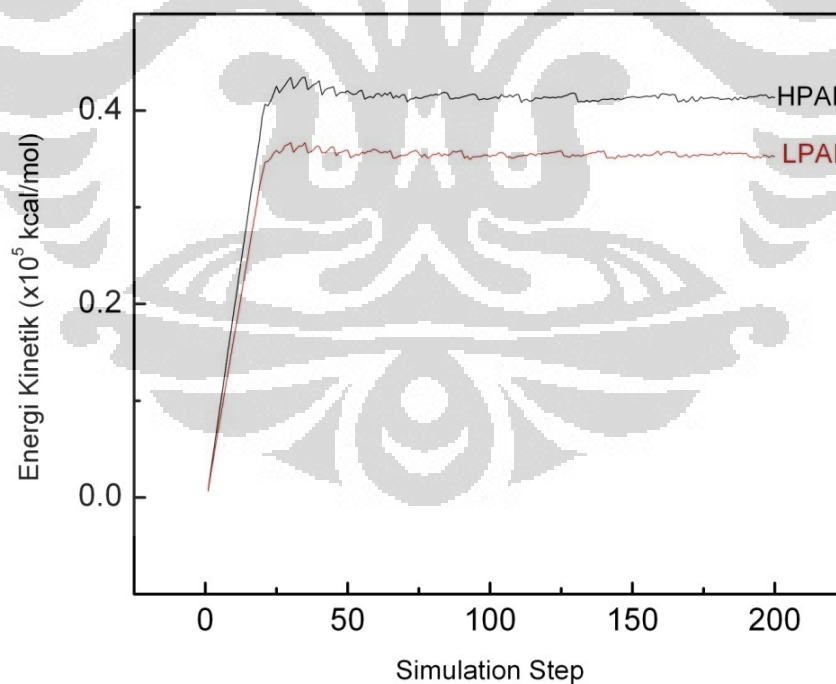
*Perbandingan Grafik Energi Potensial selama Simulasi*



Gambar 5.6: Perbandingan Grafik Energi Potensial terhadap Simulation Step model NA-SA HPAI dan LPAI

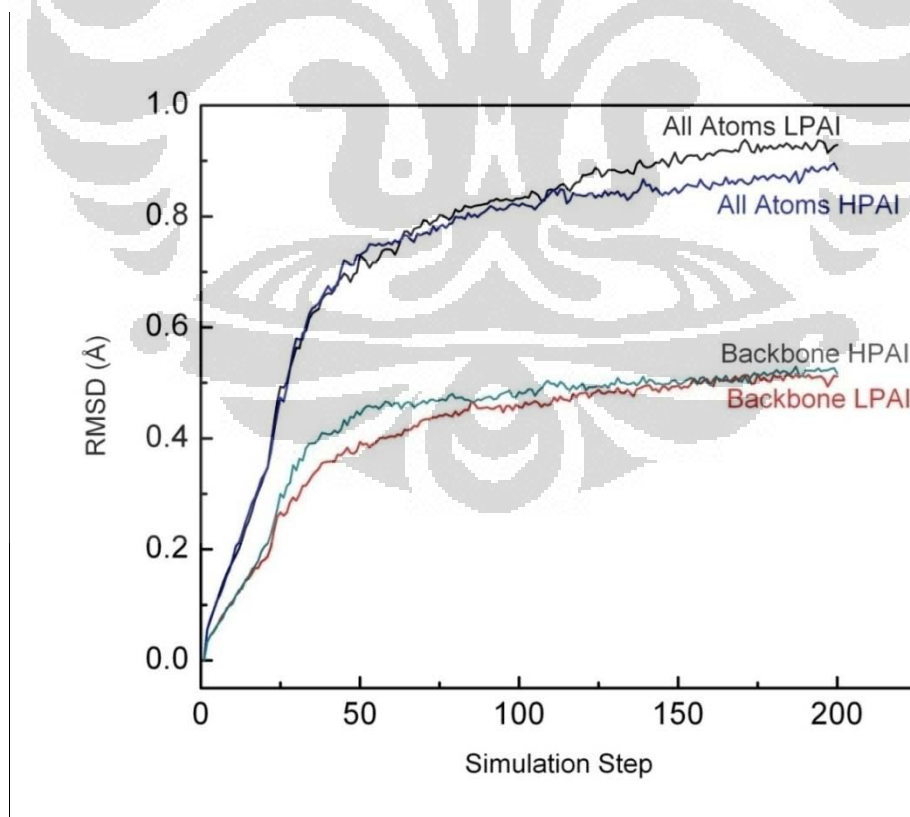
Pada grafik yang terdapat pada gambar 5.6 dapat dilihat bahwa fluktuasi energi potensial HPAI dan LPAI nyaris serupa. Namun, apabila diamati dengan teliti, keduanya dapat dibedakan dari bagaimana energi potensial kedua sistem berkurang selama simulasi. Pada HPAI, energi potensial sistem mengalami penurunan lebih curam dibanding LPAI pada selang waktu 2-10 ps (*simulation step* 20-100). Kemudian energi potensial HPAI mulai stabil dan turun dengan perlahan. Berbeda dengan HPAI, sistem model LPAI mengalami penurunan sedikit lebih cepat dibandingkan HPAI justru pada selang waktu 10-20 ps (*simulation step* 100-200). Hasil akhir energi potensial HPAI lebih kecil dibandingkan energi potensial LPAI dan hasilnya tidak jauh berbeda dibandingkan energi totalnya (lihat tabel 5.2).

#### *Perbandingan Grafik Energi Kinetik selama Simulasi*



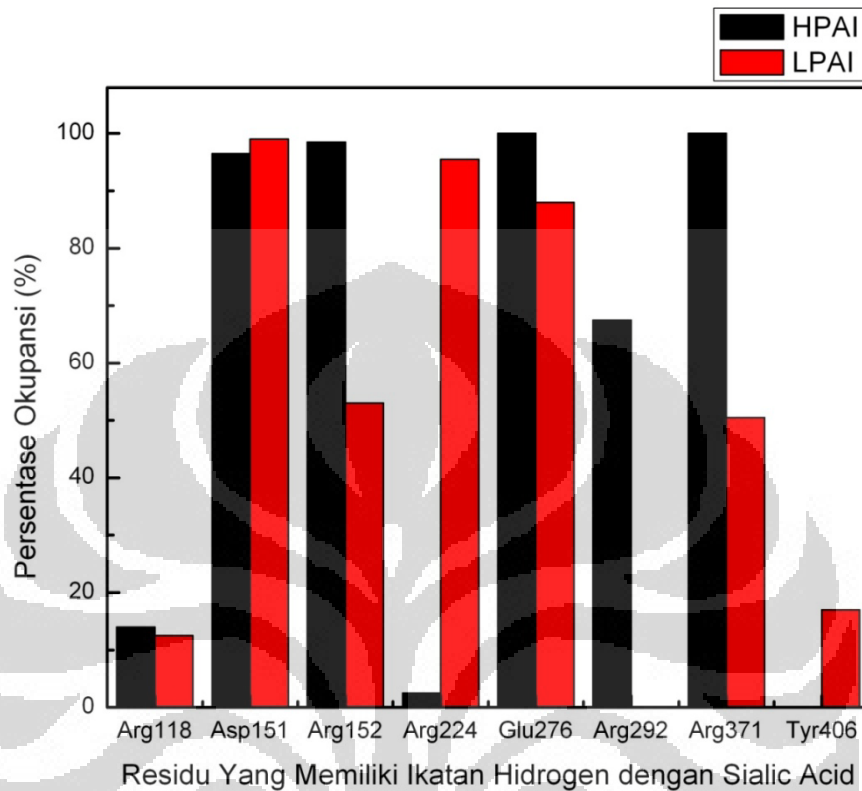
*Gambar 5.7: Perbandingan Grafik Energi Kinetik terhadap Simulation Step model NA-SA HPAI dan LPAI*

Grafik pada gambar 5.7 menunjukkan bahwa pergerakan atom-atom pada kedua model cukup stabil yang terlihat dari fluktuasinya yang tidak banyak mengalami perubahan usai proses pemanasan dihentikan. Namun, selama proses pemanasan, energi kinetik model kompleks NA-SA HPAI lebih cepat mengalami kenaikan dibandingkan model NA-SA LPAI. Hal ini menunjukkan bahwa atom-atom HPAI secara keseluruhan lebih banyak mengalami pergerakan dibandingkan atom-atom LPAI selama 2 ps pertama di awal simulasi. Perbandingan grafik di sisa waktu simulasi menunjukkan bahwa atom-atom HPAI juga lebih cepat menstabilkan diri daripada atom-atom LPAI. Hal tersebut didukung pula dari *root mean square deviation (rmsd) all atoms* LPAI yang lebih tinggi dibandingkan HPAI meskipun *rmsd backbone* HPAI sedikit lebih besar dibandingkan LPAI. RMSD *all atoms* merupakan deviasi kuadratik rata-rata untuk seluruh atom pada model. Sedangkan RMSD *backbone* hanya menghitung deviasi *backbone*-nya saja.



Gambar 5.8: Grafik Perbandingan rmsd all atoms dan backbone HPAI-LPAI selama simulasi

## 5.2 Persentase Okupansi Residu yang Berinteraksi Langsung dengan Substrat



Gambar 5.9: Perbandingan Persentase Okupansi Residu Fungsional LPAI-HPAI

Ikatan hidrogen memainkan peranan penting dalam menentukan kemampuan mengikat *neuraminidase* mengikat substrat[52,67-69]. Dengan menghitung persentase okupansi residu yang memiliki ikatan hidrogen dengan substrat, kita dapat mengetahui residu mana yang memiliki interaksi kuat dan stabil dengan substrat. Kompleks NA-SA dengan ikatan hidrogen yang memiliki stabilitas tinggi selama proses pemanasan dan simulasi berkaitan langsung dengan aktivitas yang lebih tinggi. Dari grafik pada gambar 5.9, dapat dilihat bahwa residu fungsional yang berikatan langsung dengan SA pada HPAI memiliki lebih banyak ikatan hidrogen yang stabil dibandingkan dengan LPAI. Tercatat hanya dua residu, Asp151 dan Arg224, yang memiliki persentase okupansi ikatan hidrogen di atas 90% pada LPAI. Sedangkan pada HPAI, residu yang memiliki persentase ikatan hidrogen di atas 90% ada empat residu. Yakni, Asp151,

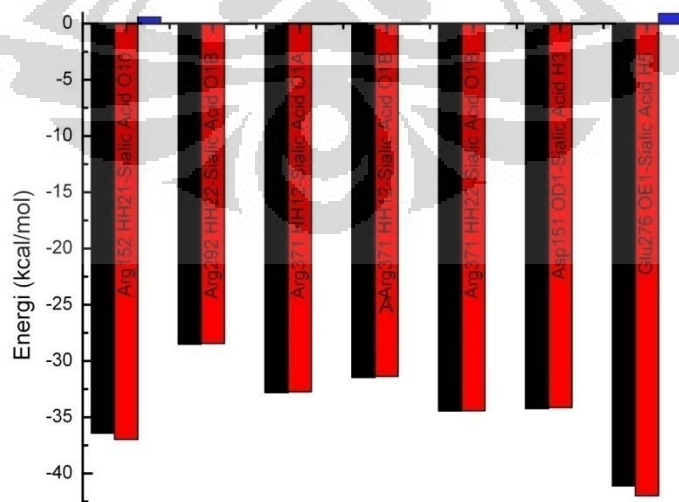
Arg152, Glu276 dan Arg371. Hasil ini cukup sesuai dengan yang hasil penelitian Le dkk [67] yang melakukan menghitung persentase okupansi ikatan hidrogen yang terjadi ketika mensimulasikan kompleks N1-*Tamiflu* dan N1-*Relenza*.

Yang perlu juga diperhatikan dalam perbandingan persentase okupansi ikatan hidrogen residu fungsional ini adalah ikatan hidrogen yang dibentuk oleh residu Arg292 dengan SA. Pada LPAI, ikatan hidrogen tersebut justru tidak terjadi sama sekali. Hal ini menunjukkan bahwa adanya kemungkinan peranan tertentu yang begitu penting dari Arg292 mengingat adanya penelitian yang menunjukkan bahwa mutasi R292K dapat menyebabkan penurunan sensitivitas virus terhadap obat[70].

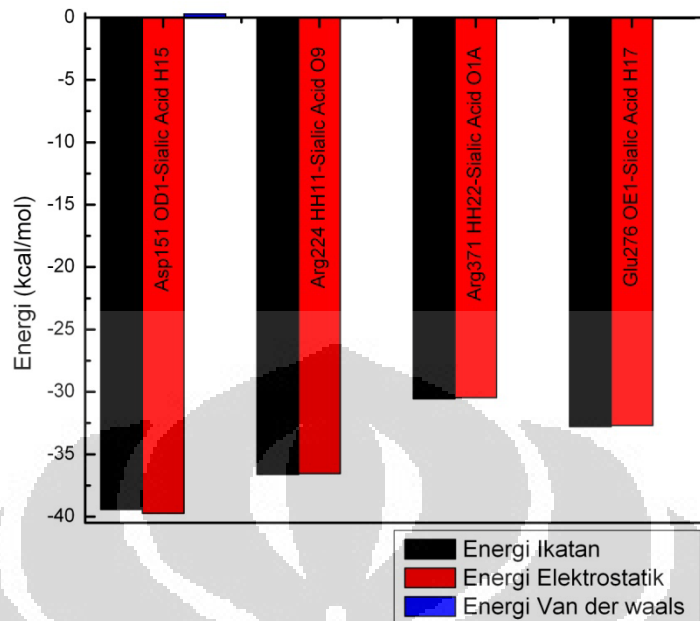
Dari perbandingan persentase okupansi ikatan hidrogen residu fungsional di atas dapat disimpulkan bahwa ikatan hidrogen residu fungsional memiliki pengaruh besar dalam menstabilkan posisi substrat SA dalam proses pemotongan virion dari sel inang. Sehingga proses katalitik yang dilakukan Asp151 dapat dilakukan lebih cepat. Dimana hal tersebut dapat mempengaruhi virulensi dan pathogenesis virus secara langsung.

### 5.3 Analisis Perubahan Konformasi Struktur

#### 5.3.1 Analisis Ikatan Hidrogen



(a)



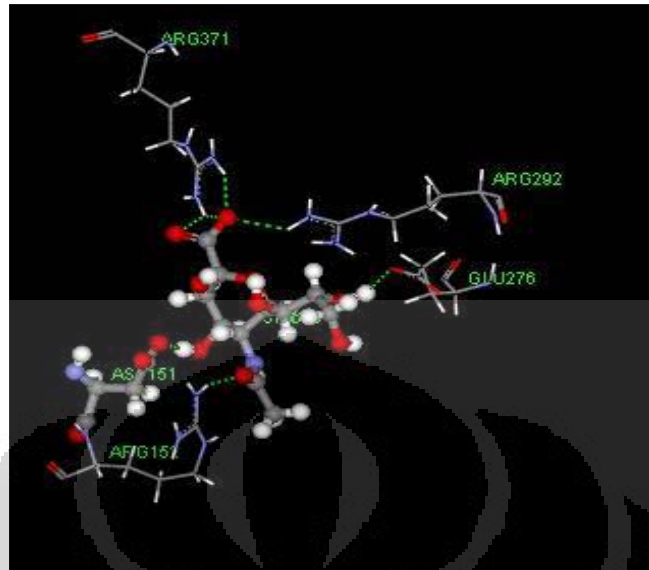
(b)

Gambar 5.10: Grafik energi ikatan hidrogen, energi elektrostatik dan energi van der waals di konformasi akhir simulasi interaksi NA-SA: a. HPAI; b. LPAI

Ikatan hidrogen merupakan sesuatu yang sangat penting dalam melihat secara detail ikatan molekul dalam suatu kompleks[62,63]. Kestabilan dan besar energi interaksi ikatan hidrogen NA-SA yang dibentuk oleh residu-residu fungsional dapat mempengaruhi proses katalitik yang akan dilakukan.

Pada gambar 5.10, dapat dibandingkan perbedaan besar energi ikatan hidrogen yang masih terbentuk pada akhir simulasi. Pada HPAI, energi interaksi terbesar diberikan oleh Arg371 yang membentuk tiga ikatan hidrogen secara langsung dengan SA. Sedangkan pada LPAI energi interaksi terbesar diberikan oleh Asp151. Arg371 justru tidak banyak memberikan kontribusi energi terhadap energi ikat total pada LPAI. Ketidakstabilan ikatan hidrogen Arg371 akan menjadi perhatian utama dalam membandingkan konformasi struktur sebelum dan sesudah simulasi kompleks NA-SA LPAI dan HPAI disebabkan perannya yang sangat penting dalam proses pengikatan [67].

## Wilayah Fungsional NA HPAI



Gambar 5.11: Residu fungsional yang berikatan langsung dengan SA pada NA HPAI di akhir simulasi: Asp151, Arg152, Glu276, Arg292 dan Arg371.

Dari *subsite* S1-S5 yang telah didefinisikan oleh Stoll dkk [71], hanya S1, S3 dan S5 saja yang beberapa residunya menjadi residu fungsional dengan stabil. Dengan tambahan residu Asp151 yang berinteraksi dengan dua cara sekaligus. Yakni dengan bantuan maupun tanpa bantuan molekul air.

Pada S1, Arg292 dan Arg371 melakukan perannya dalam menstabilkan ikatan NA-SA. Terutama Arg371 yang memiliki tiga ikatan hidrogen dengan SA sekaligus. Hal tersebut dapat dilihat melalui grafik pada gambar 5.12.

Arg118 pada awal-awal simulasi, sempat membentuk ikatan hidrogen yang stabil dengan SA. Namun ikatan tersebut mulai menghilang ketika temperatur mencapai 303.06 K dan menghilang sama sekali ketika temperatur terus naik dalam proses mencari kesetimbangan termalnya pada temperatur 318.16 K. Dugaan penyebab lepasnya ikatan hidrogen ada dua faktor. Faktor pertama adalah karena interaksi elektrostatik dengan Glu119 hingga membentuk ikatan hidrogen di antara mereka. Interaksi ini telah membuat residu Arg118 mengalami pembengkokan sudut yang dibentuk atom-atom  $\alpha$  dan  $\beta$  berubah sebesar  $5.49^\circ$  dan sudut yang dibentuk atom-atom  $NC\alpha C\beta$  berubah sebesar  $2.53^\circ$ .



Pembengkokan ini telah membuat atom HH11 yang berikatan hidrogen menjauh dari SA sejauh 0.66 Å.

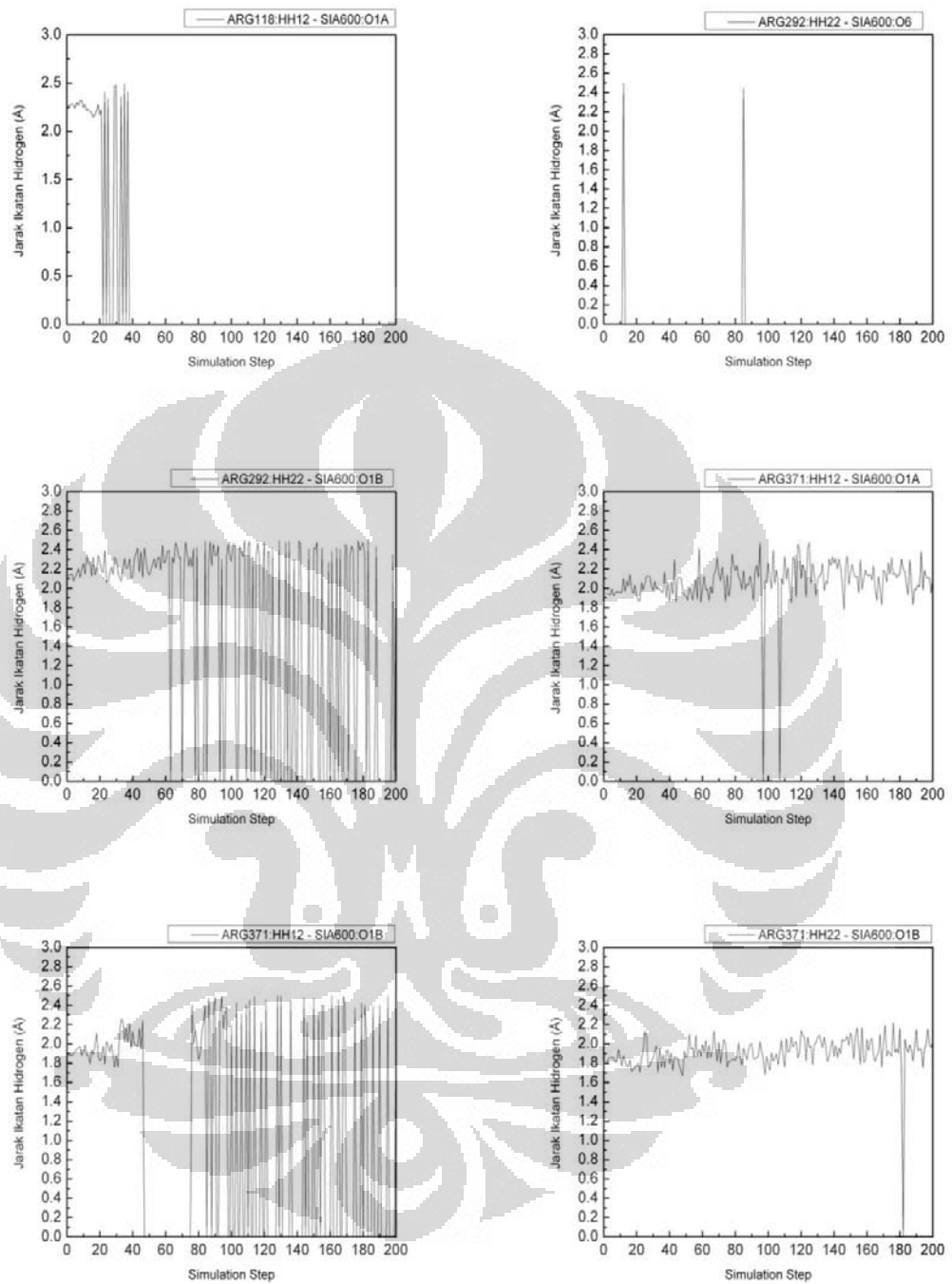
Faktor kedua adalah karena adanya pergeseran yang cukup jauh pada atom *backbone* di sekitar residu Arg118. Atom C $\alpha$  yang berada di *backbone* dihitung perubahan jaraknya untuk mengetahui seberapa besar pergeseran *backbone* di wilayah Arg118 yang diketahui hasil pergeseran yang diukur tersebut adalah sebesar 0.72 Å. Sedikit menjauhnya *backbone* diduga menjadi salah satu penyebab hilangnya ikatan hidrogen Arg118-SA yang menyebabkan persentase okupansi ikatan hidrogen Arg118-SA hanya sebesar 14%.

Arg292 membantu menstabilkan ikatan NA-SA bersama Arg371 dengan ikatan hidrogen masing-masing. Ikatan hidrogen Arg292 sangat stabil hingga akhirnya tidak mampu mempertahankan kestabilannya ketika temperatur mencapai 309.03 K meskipun hingga di bagian akhir simulasi tetap membentuk ikatan hidrogen.

Ketidakstabilan ikatan Arg292 ternyata lebih disebabkan adanya interaksi elektrostatik dengan Asn294 yang menyebabkan sudut yang dibentuk atom-atom C $\beta$ C $\gamma$ C $\delta$  membesar dari 106.43° menjadi 112.29°. Ini terlihat dari saling mendekatnya atom HE pada Arg292 dengan OD1 pada Asn294 dan membentuk ikatan hidrogen. Meskipun sebenarnya Asn294-lah yang lebih banyak mendekati Arg292 dibanding sebaliknya. Terlihat dari pergeseran atom OD1 sejauh 1.10 Å dan pergeseran HE yang hanya 0.21 Å. Jarak interaksi kedua atom tersebut mengalami perubahan dari awalnya 3.12 Å menjadi 2.11 Å. Interaksi Arg292-Asn294 menyebabkan Arg292 hanya memiliki persentase okupansi ikatan hidrogen antara Arg292-SA sebesar 67.50% saja.

Residu Arg371 merupakan residu yang berperan besar mempertahankan ikatan hidrogen pada simulasi ini. Tiga ikatan hidrogen utamanya membantu menstabilkan ikatan NA-SA sehingga keduanya dapat tetap berikatan pada simulasi ini. Dari ketiga ikatannya, hanya dua ikatan yang benar-benar stabil. Yakni antara atom HH12 dan HH22 pada Arg371 dengan masing-masing O1A dan O1B dari molekul SA.

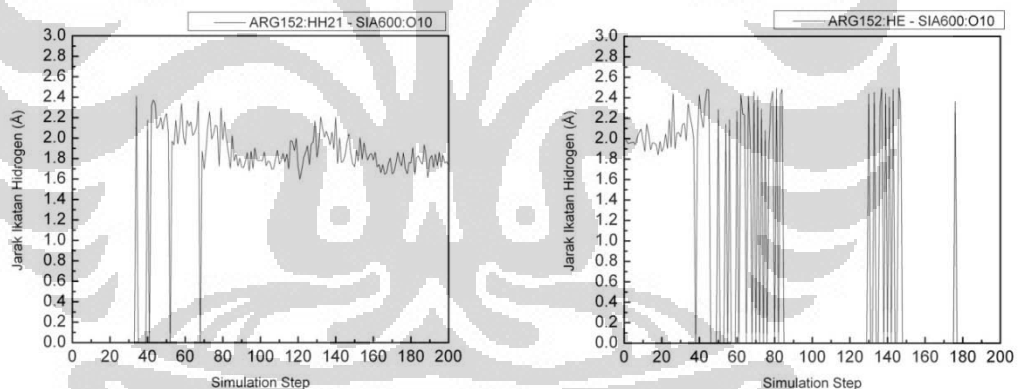




Gambar 5.12: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap simulation step pada S1 kompleks NA-SA  
HPAI

Stabilnya ikatan-ikatan hidrogen yang menjembatani residu Arg371 dengan SA diakibatkan oleh kekuatan ikatan itu sendiri. Hal ini terlihat dari ikut bergesernya atom-atom SA yang berinteraksi dengan Arg371. Atom O1A pada SA bergeser sejauh 0.14 Å mengikuti atom HH12 pada Arg371. Atom O1B pada SA bergeser sejauh 0.71 Å mengikuti atom HH12 dan HH22 pada Arg371 yang bergeser masing-masing sejauh 0.31 Å dan 1.04 Å. Persentase okupansi ikatan hidrogen Arg371-SA selama simulasi diketahui sebesar 100%.

Melalui tinjauan energetik, wilayah S1 memberikan kontribusi energi terhadap energi total residu-residu fungsional sebesar 53.24% dan terhadap energi bebas ikatan sebesar 36.30%. Energi interaksi yang relatif besar dibandingkan dengan residu fungsional lainnya inilah yang membuat pergeseran *backbone* di sekitar Gly373 dan Asp369 masing-masing sebesar 1.25 Å dan 0.82 Å menjadi tak banyak berarti.



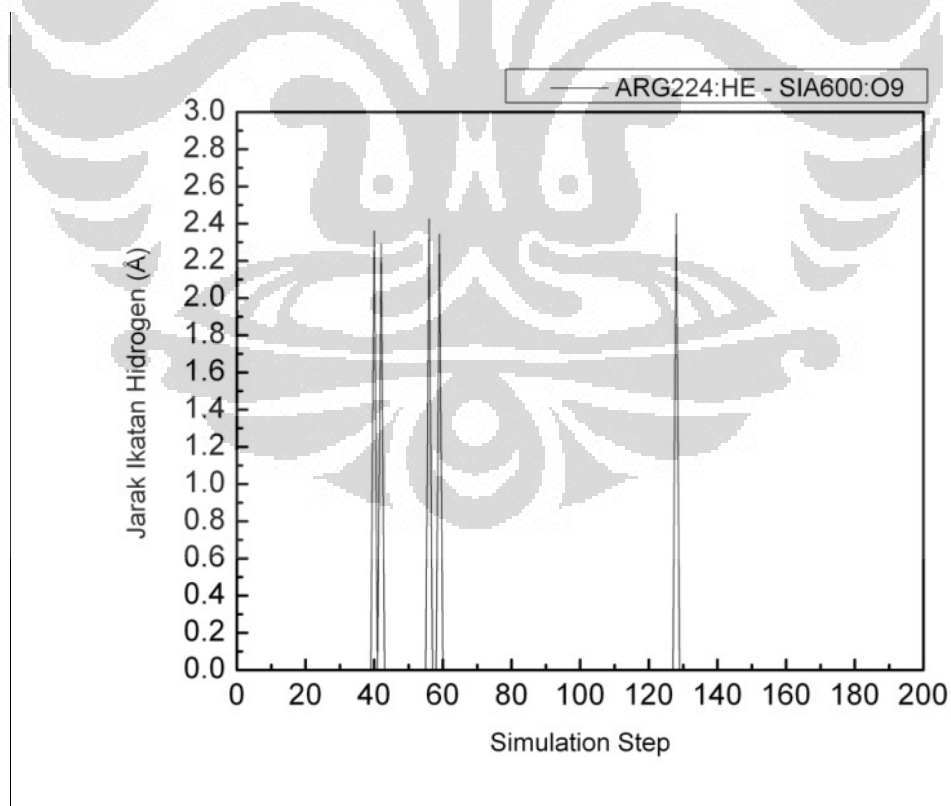
Gambar 5.13: Grafik jarak ikatan hidrogen berbanding simulation step pada S3 kompleks NA-SA HPAI.

Pada S3, Arg152 cukup besar memberikan kontribusinya dalam mempertahankan ikatan selama simulasi. Meskipun pada wilayah ini hanya Arg152 yang menjadi residu fungsional, namun tetap dapat mempertahankan interaksinya dengan SA. Pada awal simulasi, ikatan hidrogen residu ini dibentuk oleh atom HE dengan atom O10 SA. Hingga pada *simulation step* ke-38, kestabilan ikatan mereka terganggu. Namun begitu, ikatan hidrogen pada residu

Arg152-SA yang hilang segera digantikan atom HH21 dengan atom O10 SA mulai dari *simulation step* 42 hingga akhir simulasi dengan cukup stabil yang dapat dilihat melalui grafik pada gambar 5.13. Berpindahannya letak ikatan hidrogen ini lebih disebabkan adanya interaksi elektrostatik antara Arg152 dengan Asp151. Atom HE yang awalnya membentuk ikatan hidrogen mengalami pergeseran yang cukup jauh. Yakni sebesar 1.08 Å.

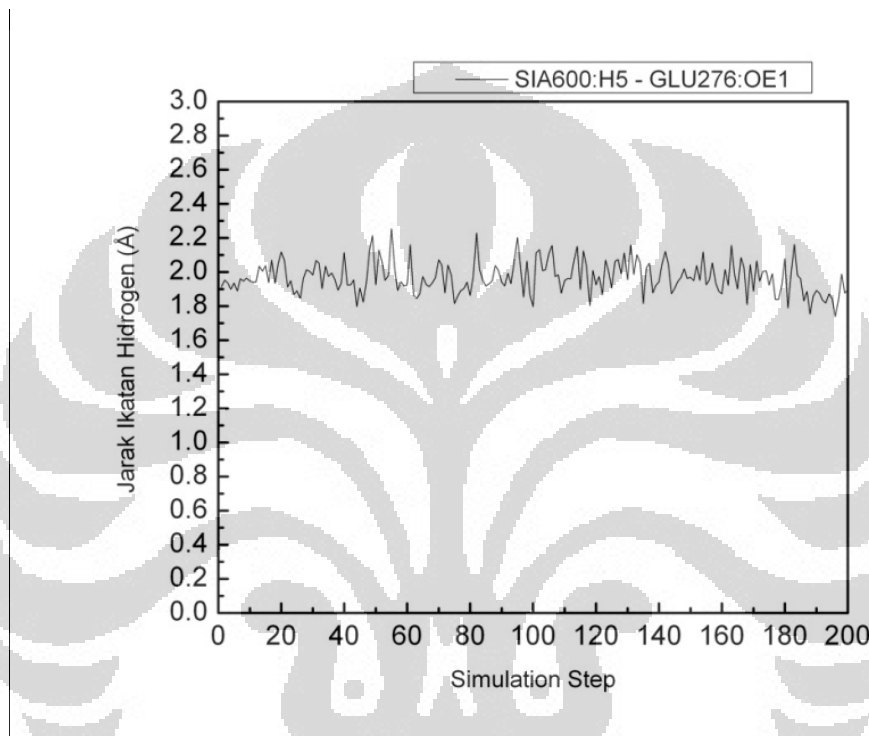
Interaksi elektrostatik telah menekuk Arg152 sehingga sudut  $C\gamma C\beta C\alpha$  dan  $C\beta C\gamma C\delta$  mengalami perubahan sudut sebesar  $4.07^\circ$  dan  $-2.98^\circ$ . Sudut torsional  $C\alpha C\beta C\gamma C\delta$  pun berubah dari  $176.25^\circ$  hingga  $163.03^\circ$ . Pembengkokan sudut yang terjadi juga diketahui membuat atom HH21 yang awalnya cukup jauh dan tidak memiliki ikatan hidrogen dengan SA secara langsung bergeser sejauh 0.91 Å dan membentuk ikatan hidrogen yang cukup stabil dengan SA.

Wilayah S3 ini memberikan kontribusi energi sebesar 15.24% terhadap energi total residu-residu fungsional dan 10.39% dari energi bebas ikatan.



Gambar 5.14: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S4 kompleks NA-SA HPAI.

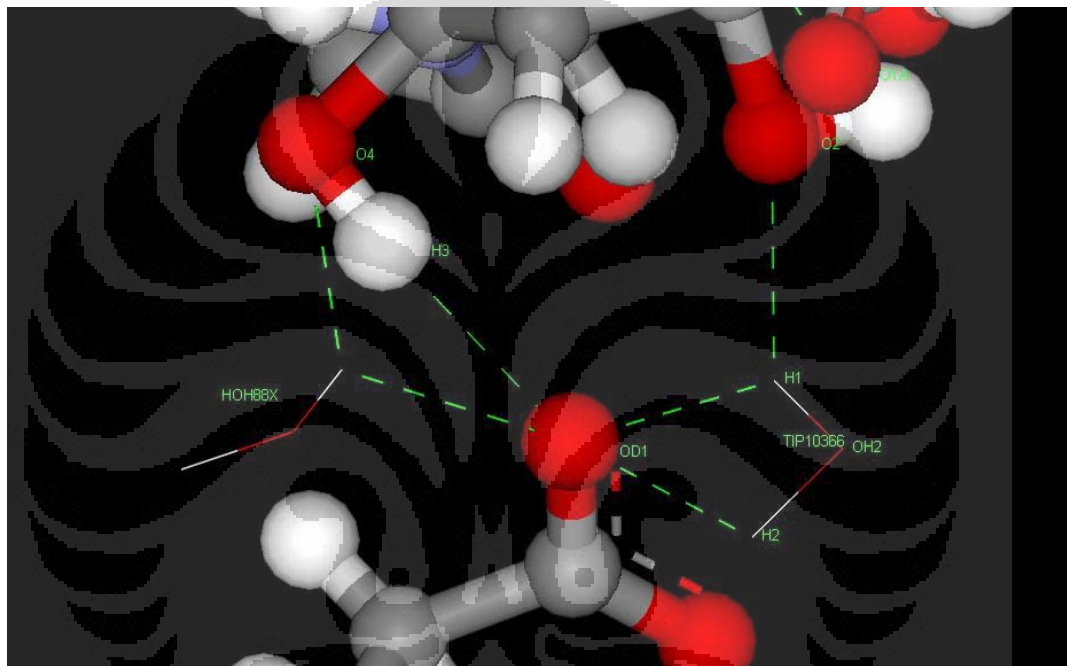
Pada S4 diketahui sempat terbentuk ikatan hidrogen, namun hanya 5 kali selama simulasi ini. Dengan persentase okupansi yang rendah, 2.5 %, sulit untuk melihat peran residu ini sebagai residu fungsional dalam proses pemotongan virus dari SA pada model kompleks NA-SA HPAI. Sehingga keberadaan ikatan hidrogen Arg224 dengan SA serta kontribusinya dapat diabaikan dalam membantu kestabilan ikatan NA-SA HPAI.



Gambar 5.15: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S5 kompleks NA-SA HPAI.

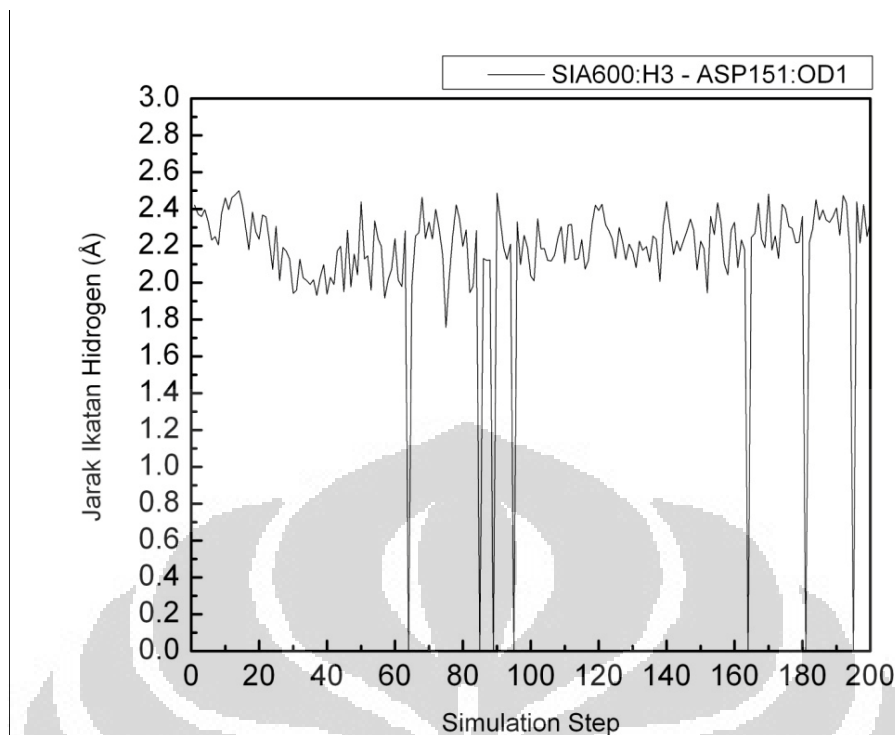
Pada S5, Glu276 berhasil mempertahankan ikatannya dengan persentase okupansi 100% dan memberikan kontribusi energi ikatan tunggal yang paling besar di antara residu fungsional lainnya. Dari grafik pada gambar 5.15 dapat dilihat jelas bahwa keberadaan ikatan hidrogen wilayah ini yang diwakili Glu276 memiliki peran penting dalam menjaga ikatan NA-SA dengan kestabilan yang sangat tinggi, tanpa kehilangan ikatan hidrogen sekalipun, meski hanya dengan satu ikatan hidrogen saja. Adapun kontribusi energi wilayah S5 ini terhadap energi total residu-residu fungsional sebesar 17.20% dan terhadap energi bebas ikatan sebesar 11.72%.

Selain *subsite* S1, S3 dan S5, residu Asp151 turut membentuk ikatan hidrogen dengan SA. Keberadaannya yang dipercaya sebagai “eksekutor” katalitik enzim dengan bantuan air membuat Asp151 tidak bisa diabaikan begitu saja. Asp151 pada konformasi akhir simulasi dengan kompleks NA-SA HPAI diketahui memiliki dua jenis ikatan (lihat gambar 5.16). Yakni tanpa dan dengan perantaraan molekul air. Hal ini disebabkan sifat polar asam amino Aspartat yang membuatnya mempunyai kemampuan menciptakan ikatan hidrogen dengan molekul-molekul air. Yang pada LPAI hal ini justru tidak terjadi.



*Gambar 5.16: Asp151 (bawah) yang berinteraksi dengan dua cara dengan sialic acid (atas): langsung dan tidak langsung (perantaraan air)*

Dari grafik pada gambar 5.17 dapat dilihat bahwa selama simulasi, keberadaan ikatan hidrogen residu Asp151 cukup stabil dan hanya kehilangan ikatan hidrogen tersebut sebanyak 7 kali. Meski mengalami interaksi dengan Arg152, yang menyebabkan adanya ikatan hidrogen di antara mereka berdua, jarak ikatan hidrogen antara Asp151 dengan SA tidak banyak berubah. Pergeseran atom OD1 pada Asp151 sejauh 1.43 Å justru membuat jarak ikatan hidrogen mengalami penyusutan dari 2.42 Å menjadi 2.33 Å.



Gambar 5.17: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu dari Asp151 kompleks NA-SA HPAI.

Secara energetik, kontribusi residu Asp151 terhadap energi total interaksi residu-residu fungsional adalah sebesar 14.32%. Kontribusi energi terhadap energi bebas ikatan sebesar 9.77%. Di akhir simulasi, tersisa 7 ikatan hidrogen yang energi interaksi masing-masing ikatan dihitung untuk melihat kontribusi energi masing-masing ikatan. Arg371 merupakan residu yang paling besar dalam mengikat SA dengan tiga ikatan hidrogen yang stabil (lihat grafik 5.10a).

Tabel 5.3: Perbandingan Energi Bebas Ikatan dan RMSD

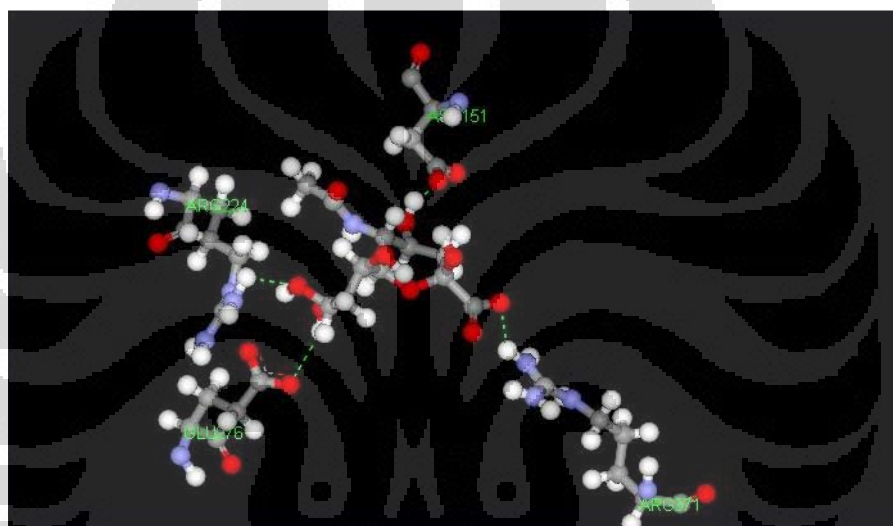
	$\Delta G$ (kcal/mol)	All Atoms	Backbone
Tokyo/A/3/67	-350.62	0.88	0.51
Pennsylvania/A/10218/84	-231.59	0.92	0.51

Hasil penghitungan energi bebas ikatan yang dilakukan pada konformasi terakhir simulasi NA-SA HPAI adalah sebesar -350.62 kcal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi ikatan NA-SA HPAI relatif kuat [50,51] yang memungkinkan virion-virion lebih cepat terpotong dari sel inang.

Tabel 5.4: Data kontribusi energi masing-masing ikatan di konformasi terakhir simulasi interaksi NA-SA HPAI

	E <sub>binding</sub> (kcal/mol)	Jarak (Angstrom)	E <sub>vdw</sub> (kcal/mol)	E <sub>elektrostatik</sub> (kcal/mol)
Arg 292 (HH22) dengan C1 Sialic Acid (O1B)	-28.51946	2.45168	-0.07572	-28.44374
Arg 371 (HH12) dengan C1 Sialic Acid (O1A)	-32.8357	2.12844	-0.07232	-32.76338
Arg 371 (HH12) dengan C1 Sialic Acid (O1B)	-31.46621	2.22241	-0.08801	-31.37819
Arg 371 (HH22) dengan C1 Sialic Acid (O1B)	-34.45278	2.02474	-0.01138	-34.44139
Asp 151 (OD1) dengan C4 Sialic Acid (H3)	-34.23702	2.33351	-0.08371	-34.15331
Arg 152 (HH12) dengan C5 Sialic Acid (O10)	-36.42410	1.72827	0.56299	-36.98709
Glu 276 (OE1) dengan C6 Sialic Acid (H5)	-41.10644	1.89838	0.87526	-41.98169
<b>Total</b>	<b>-239.04171</b>		<b>1.34316</b>	<b>-147.56348</b>

### Wilayah Fungsional NA LPAI



Gambar 5.18: Residu fungsional yang berikatan langsung dengan SA pada NA LPAI di akhir simulasi: Asp151, Arg224, Glu276 dan Arg371.

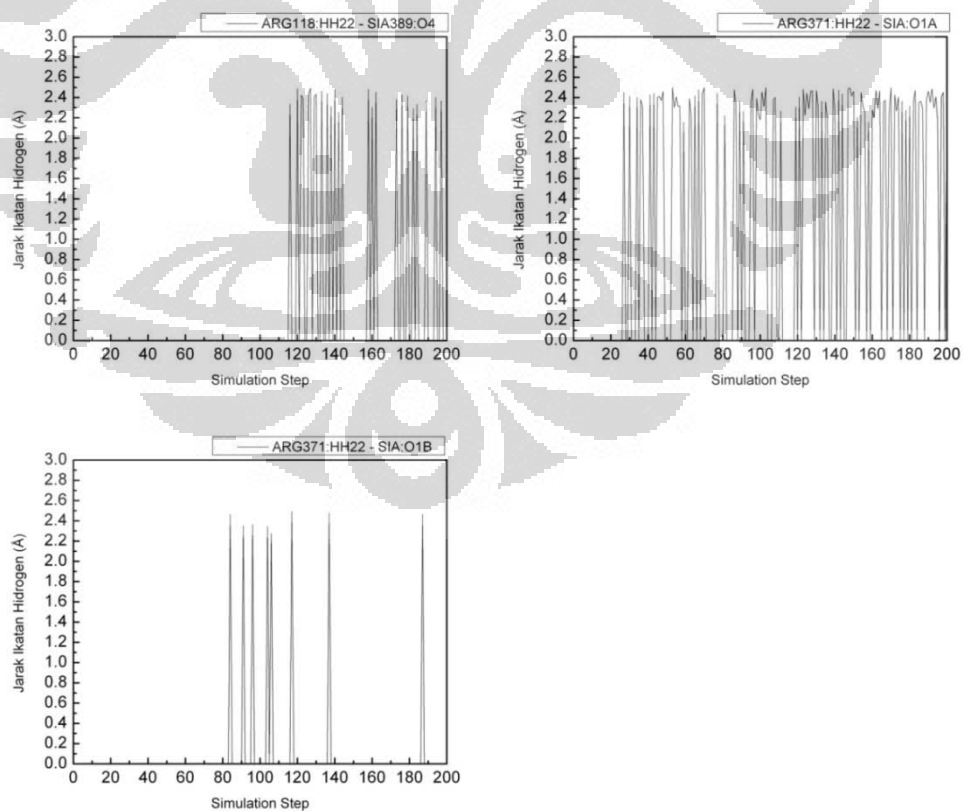
Pada LPAI, hanya S4, S5 dan Asp151 saja yang melakukan perannya sebagai residu fungsional dengan baik. Yakni, membentuk ikatan hidrogen secara langsung dengan stabil. Selain itu, terdapat pula ikatan yang tidak terlalu stabil pada S1 dan S3 serta residu Tyr406 yang tidak masuk wilayah *subsite* manapun yang dikarakterisasi Stoll dkk [71].

Pada wilayah S1, Arg118 tak membentuk ikatan hidrogen pada awal simulasi. Baru pada saat simulasi mencapai *simulation step* 116, temperatur 307.56 K, barulah Arg118 mulai membentuk ikatan hidrogen meski tidak stabil dengan persentase okupansi 12.5%. Pembentukan ikatan hidrogen yang sempit

terjadi disebabkan interaksi elektrostatik Arg118 dengan Glu119 yang menekuk residu Arg118 hampir di seluruh bagian atom karbonnya sehingga atom HH22 dapat mendekati atom OE1 dan OE2 hingga sejauh 3.50 Å meskipun tidak membuat ikatan hidrogen dengan keduanya.

Residu Arg371, yang pada kompleks NA-SA HPAI menjadi salah satu residu yang berperan besar mempertahankan interaksi NA-SA, justru tidak banyak berperan pada interaksi NA-SA LPAI. Bahkan sejak awal simulasi, Arg371 tidak membentuk ikatan hidrogen. Tidak seperti pada HPAI. Pada saat *simulation step* mencapai 29, barulah Arg371 membentuk ikatan hidrogen yang agak labil. Dugaan faktor penyebabnya mengarah pada adanya mutasi residu 370. Persentase okupansi Arg371 hanya sebesar 50.5%.

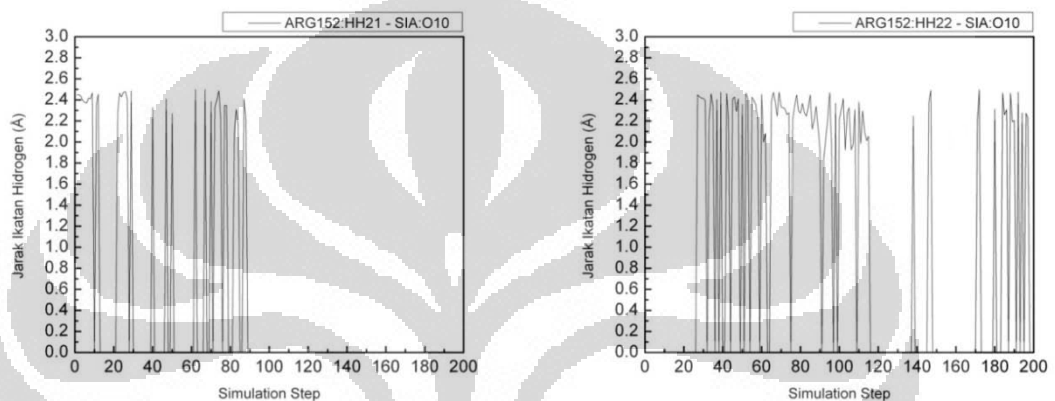
Dari tinjauan energetik, S1 memberikan kontribusi energi terhadap energi total interaksi residu fungsional sebesar 21.91% dan terhadap energi bebas ikatan sebesar 13.19%.



Gambar 5.19: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S1 kompleks NA-SA LPAI

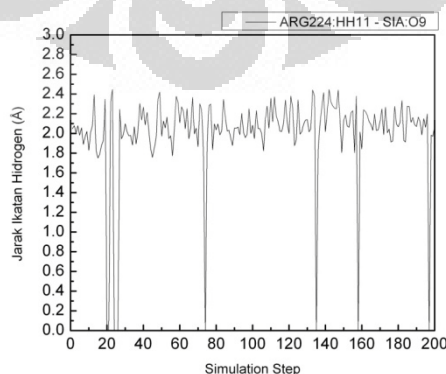


Pada wilayah S3, Arg152 membentuk ikatan hidrogen dengan SA. Namun residu ini tidak berhasil mempertahankan kestabilan ikatannya meski terdapat dua ikatan hidrogen. Bahkan ikatan hidrogen itu sempat hilang pada *simulation step* 116-137 dan 148-170. Residu Arg152 banyak mengalami perubahan posisi. Yang paling besar mengalami perubahan sudut adalah sudut  $C\alpha C\beta C\gamma$  berubah dari  $107.27^\circ$  menjadi  $117.60^\circ$  dan sudut  $C\gamma C\delta NE$  yang berubah dari  $115.80^\circ$  menjadi  $110.59^\circ$ . Persentase okupansi residu ini hanya mencapai 53%.



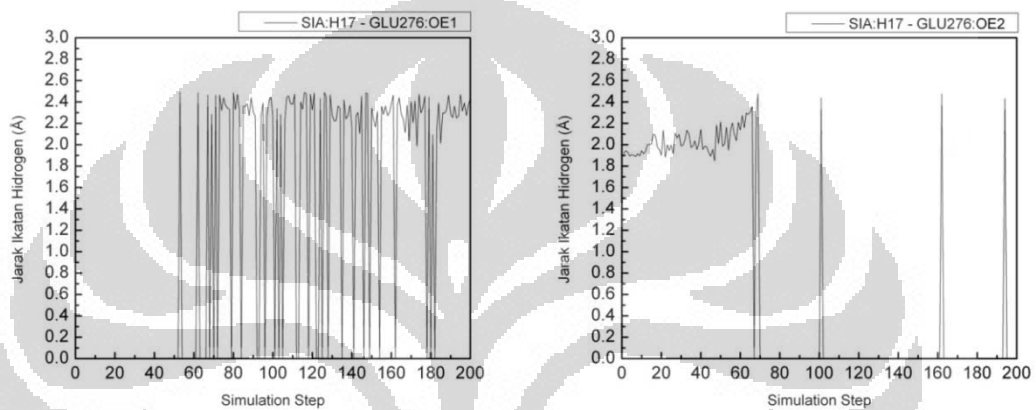
Gambar 5.20: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S3 kompleks NA-SA LPAI.

Wilayah S4 yang diwakili Arg224 pada kompleks NA-SA LPAI ternyata merupakan wilayah yang cukup stabil dalam membentuk ikatan hidrogen dengan persentase okupansi sebesar 95.50%. Kontribusi energi residu Arg224 terhadap energi interaksi ikatan SA dengan residu fungsional adalah sebesar 26.27%. Sedangkan kontribusinya terhadap energi bebas ikatan sebesar 15.81%.



Gambar 5.21: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S4 kompleks NA-SA LPAI.

Pada wilayah S5, Glu276 awalnya membentuk ikatan hidrogen dengan SA melalui atom OE2. Namun pada *simulation step* 68, yakni ketika temperatur sistem mencapai 305.70 K, ikatan hidrogen digantikan oleh atom OE1 karena terjadinya pemutaran kepala OE1-C $\delta$ -OE2. Sehingga pada akhir simulasi OE1-lah yang membentuk ikatan hidrogen dengan SA. Secara keseluruhan, kestabilan interaksi residu Glu276 dapat dinyatakan dengan persentase okupansinya yang sebesar 88%.

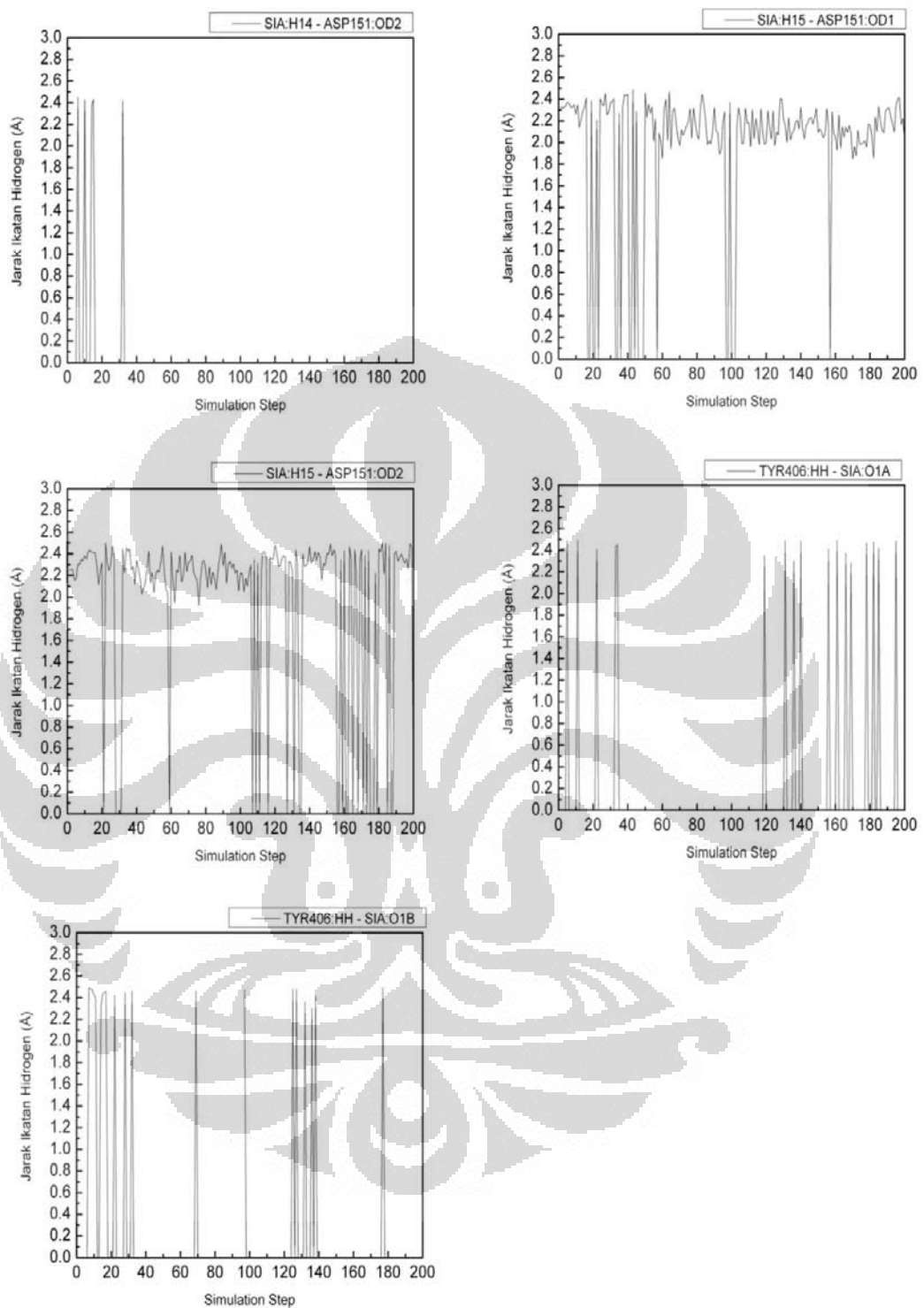


Gambar 5.22: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada S5 kompleks NA-SA LPAI.

Kontribusi energi interaksi Glu276-SA terhadap energi total interaksi residu fungsional NA-SA sebesar 23.53%. Sedangkan kontribusinya terhadap energi bebas ikatan adalah sebesar 14.16%.

alam simulasi interaksi NA-SA LPAI ini juga terlihat dua residu *additional* yang membentuk ikatan hidrogen selama simulasi. Yakni, Asp151 dan Tyr406.

Keberadaan interaksi Tyr406 yang membentuk ikatan hidrogen tidak banyak membantu kompleks NA-SA LPAI dalam mempertahankan kestabilan ikatannya. Hal ini terlihat dari grafik 5.17 yang menunjukkan keberadaan ikatan hidrogen yang tidak menentu. Kadang muncul dan seringkali menghilang sehingga besar persentase okupansi residu Tyr406 tak lebih hanya 17%.



Gambar 5.23: Grafik jarak ikatan hidrogen terhadap waktu pada Asp151 dan Tyr406 kompleks NA-SA LPAI.

Berbeda dengan Tyr406, Asp151 justru menjadi residu yang paling stabil membentuk ikatan hidrogen secara langsung, meskipun ikatan hidrogen tersebut sering berpindah posisi seperti yang dilihat melalui grafik pada gambar 5.23. Kontribusi ikatan hidrogen residu Asp151 terhadap kestabilan interaksi NA-SA LPAI dapat diwakili persentase okupansinya yang mencapai 99%.

Secara energetik, kontribusi energi interaksi Asp151-SA terhadap energi total interaksi residu fungsional NA-SA sebesar 28.89% dan menjadi yang terbesar di antara residu fungsional NA LPAI lainnya. Sedangkan kontribusinya terhadap energi bebas ikatan adalah sebesar 17.03%.

Pada akhir simulasi dilakukan penghitungan energi interaksi residu fungsional yang masih mempertahankan ikatan hidrogennya. Hanya terdapat empat ikatan hidrogen yang tersisa. Asp151 menjadi residu dengan kontribusi energi interaksi terbesar pada simulasi interaksi NA-SA LPAI.

Kalkulasi energi bebas ikatan pada simulasi interaksi NA-SA LPAI didapatkan sebesar -231.59 kcal/mol (lebih positif dibanding HPAI) dan itu menunjukkan bahwa NA LPAI lebih lemah dalam mengikat SA dibandingkan HPAI.

Tabel 5.5: Data kontribusi energi masing-masing ikatan di konformasi terakhir simulasi interaksi NA-SA LPAI

	Ebinding (kcal/mol)	Jarak (Angstrom)	Evdw (kcal/mol)	Eelektrostatik (kcal/mol)
Arg 371 (HH22) dengan C1 Sialic Acid (O1A)	-30.54329	2.28979	-0.0885	-30.45479
Asp 151 (OD1) dengan C4 Sialic Acid (H3)	-39.42947	2.43709	0.29642	-39.72589
Arg 224 (HH11) dengan C5 Sialic Acid (O9)	-36.61749	2.06769	-0.08097	-36.53652
Glu 276 (OE1) dengan C6 Sialic Acid (H17)	-32.79071	2.00618	-0.08886	-32.70185
<b>Total</b>	<b>-139.38096</b>		<b>0.03809</b>	<b>-139.41905</b>

### 5.3.2 Analisis Mutasi

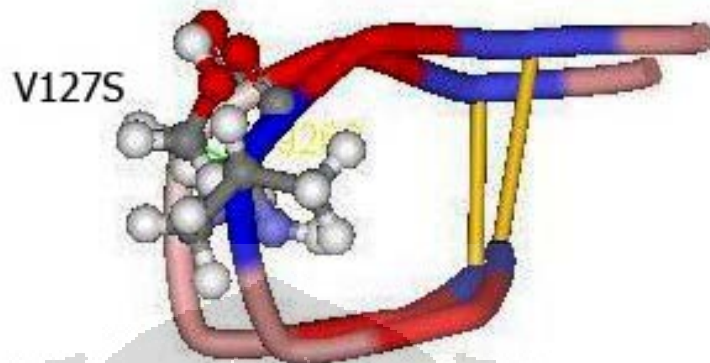
Analisis mutasi dilakukan untuk melihat adanya kemungkinan mutasi dalam menyebabkan perubahan konformasi struktur yang dapat mempengaruhi kestabilan ikatan hidrogen residu fungsional. Hal ini sangat penting mengingat perubahan residu yang terjadi tentu saja menjadikan adanya perbedaan sifat elektrostatik di wilayah tersebut.

Tabel 5.6: Daftar Mutasi Model LPAI dari file template (HPAI)

Asam Amino	Posisi	Mutasi	Polaritas	Hidrophobisitas	Muatan Rantai Samping
Valin (V)	127	Serin (S)	nonpolar -> polar	4.2 -> -0.8	netral -> netral
Aspartat (D)	147	Glisin (G)	polar -> nonpolar	-3.5 -> -0.4	negatif -> netral
Valin (V)	149	Isoleusin (I)	nonpolar -> nonpolar	4.2 -> 4.5	netral -> netral
Arginin (R)	172	Lisin (K)	polar -> polar	-4.5 -> -3.9	positif -> positif
Isoleusin (I)	194	Valin (V)	nonpolar -> nonpolar	4.5 -> 4.2	netral -> netral
Lisin (K)	199	Arginin (R)	polar -> polar	-3.9 -> -4.5	positif -> positif
Arginin (R)	210	Metionin (M)	polar -> nonpolar	-4.5 -> 1.9	positif -> netral
Glutamat (E)	258	Arginin (R)	polar -> polar	-3.5 -> -4.5	negatif -> positif
Valin (V)	263	Isoleusin (I)	nonpolar -> nonpolar	4.2 -> 4.5	netral -> netral
Alanin (A)	269	Serin (S)	nonpolar -> polar	1.8 -> -0.8	netral -> netral
Valin (V)	275	Isoleusin (I)	nonpolar -> nonpolar	4.2 -> 4.5	netral -> netral
Tirosin (Y)	284	Serin (S)	polar -> polar	-1.3 -> -0.8	netral -> netral
Glisin (G)	286	Asparagin (N)	nonpolar -> polar	-0.4 -> -3.5	netral -> netral
Isoleusin (I)	290	Valin (V)	nonpolar -> nonpolar	4.5 -> 4.2	netral -> netral
Valin (V)	303	Isoleusin (I)	nonpolar -> nonpolar	4.2 -> 4.5	netral -> netral
Glutamat (E)	308	Alanin (A)	polar -> nonpolar	-3.5 -> 1.8	negatif -> netral
Arginin (R)	331	Serin (S)	polar -> polar	-4.5 -> -0.8	positif -> netral
Asparagin (N)	334	Serin (S)	polar -> polar	-3.5 -> -0.8	netral -> netral
Asparagin (N)	339	Aspartat (D)	polar -> polar	-3.5 -> -3.5	netral -> negatif
Threonin (T)	346	Asparagin (N)	polar -> polar	-0.7 -> -3.5	netral -> netral
Glutamin (Q)	347	Prolin (P)	polar -> nonpolar	-3.5 -> -1.6	netral -> netral
Leusin (L)	360	Valin (V)	nonpolar -> nonpolar	3.8 -> 4.2	netral -> netral
Leusin (L)	370	Serin (S)	nonpolar -> polar	3.8 -> -0.8	netral -> netral
Lisin (K)	378	Arginin (R)	polar -> polar	-3.9 -> -4.5	positif -> positif
Serin (S)	384	Alanin (A)	polar -> nonpolar	-0.8 -> 1.8	netral -> netral
Prolin (P)	386	Serin (S)	nonpolar -> polar	-1.6 -> -0.8	netral -> netral
Isoleusin (I)	392	Threonin (T)	nonpolar -> polar	4.5 -> -0.7	netral -> netral
Serin (S)	400	Asparagin (N)	polar -> polar	-0.8 -> -3.5	netral -> netral
Aspartat (D)	401	Asparagin (N)	polar -> polar	-3.5 -> -3.5	negatif -> netral
Arginin (R)	403	Triptophan (W)	polar -> nonpolar	-4.5 -> -0.9	positif -> netral
Glisin (G)	414	Serin (S)	nonpolar -> polar	-0.4 -> -0.8	netral -> netral
Lisin (K)	431	Prolin (P)	polar -> nonpolar	-3.9 -> -1.6	positif -> netral



## 1. V127S

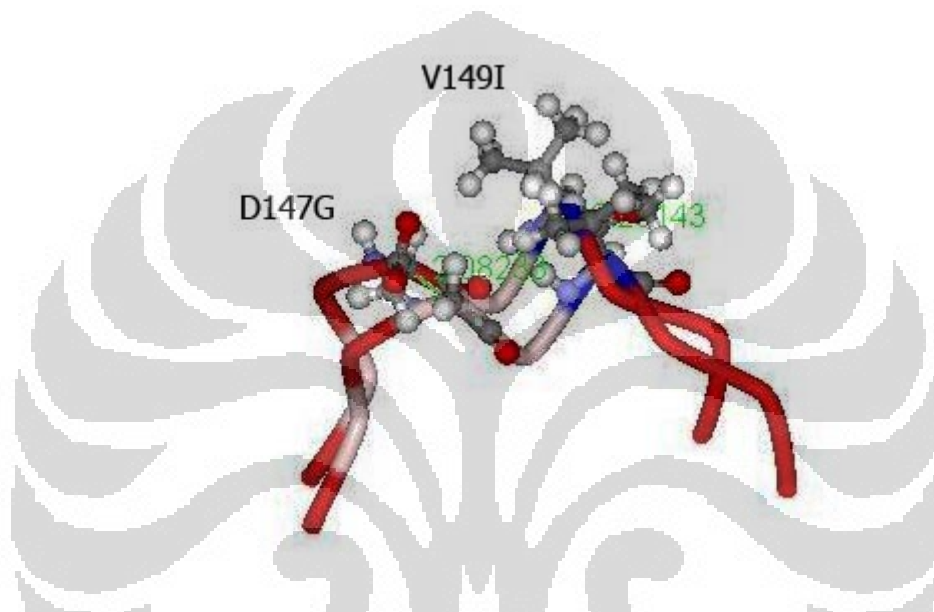


Gambar 5.24: Fitting Mutasi Residu 127 NA LPAI-HPAI

Mutasi V127S menunjukkan bahwa dalam pembuatan model NA virus LPAI telah dimutasikan dari file *template* asam amino urutan 127 dari Valin menjadi Serin. Perubahan polaritas asam amino dari nonpolar menjadi polar serta perubahan indeks *hidropathy* dari 4.2 menjadi -0.8 mempengaruhi perubahan posisi *backbone* karena perubahan interaksinya dengan molekul-molekul air. Asam amino non polar mengalami kesulitan untuk dapat larut dalam air karena tidak dapat berikatan hidrogen dengan air. Ketika asam amino berubah dari non polar menjadi polar, maka asam amino tersebut akan lebih banyak berinteraksi dengan molekul-molekul air yang ada di sekitarnya. Hasil akhir simulasi menunjukkan bahwa pergeseran *backbone* yang dihitung berdasarkan jarak atom C $\alpha$  residu 127 dari LPAI dan HPAI adalah sebesar 1.49269 Angstrom. Namun, karena residu ini berada di lekukan *backbone*, kemungkinan bahwa mutasi di wilayah ini akan memberikan kontribusi besar bagi terjadinya perubahan konformasi yang terjadi pada wilayah baik yang dekat maupun yang jauh sebagai efek berantai yang dihasilkan haruslah lebih diperhatikan. Hal tersebut dapat diamati mulai dari semakin melebarnya jembatan disulfida yang dibentuk residu Cys124 dengan Cys129 yang berada di dekat residu 127 usai dimutasikan. Pada *template* HPAI, panjang jembatan disulfida yang dihitung dari jarak atom C $\beta$  kedua residu adalah sebesar 2.0349 Å. Setelah dimutasikan, jaraknya bertambah sejauh 0.07156 Å.

Fakta bahwa telah terjadi perubahan berat molekul residu 127 dari 101.15 Da menjadi 89.096 Da dan berkurangnya jumlah atom dari 16 menjadi 11 atom turut memperbesar kemungkinan bahwa mutasi V127S memberikan pengaruh cukup signifikan terhadap perubahan konformasi lokal (dalam hal ini didefinisikan sebagai konformasi pada radius 3.5-4 Å dari residu terkait) meskipun pada efek akumulatif mutasi secara keseluruhan masih diragukan perannya.

## 2. D147G dan V149I



Gambar 5.25: Fitting Mutasi Residu 147 dan 149 NA LPAI-HPAI

Pada mutasi 147, Aspartat yang memiliki berat molekul 116.10 Da dan 12 atom berubah menjadi Glisin yang hanya memiliki 7 buah atom dan berat molekul hanya 59.07 Da. Hal tersebut telah menyebabkan terjadinya perubahan polaritas asam amino dari polar menjadi nonpolar, mengubah hidrofobisitas dari -3.5 menjadi -0.4 serta mengubah muatan rantai sampingnya dari negatif menjadi netral. Hal tersebut menyebabkan pada akhir simulasi, jarak pergeseran *backbone* pada wilayah tersebut menjadi sebesar 2.08233 Å karena adanya perbedaan interaksi dengan molekul-molekul air.

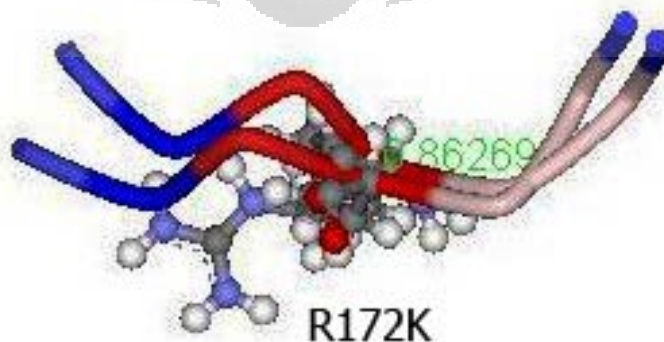
Pada mutasi 149, perubahan Valin menjadi Isoleusin hanya menyebabkan perubahan hidrofobisitasnya saja yang bertambah sedikit dari 4.2 menjadi 4.5. Polaritas dan muatan rantai sampingnya sama-sama nonpolar dan netral. Berat molekul keduanya juga tak jauh berbeda. Berat molekul Valin adalah 101.15 Da

dan berat molekul Isoleusin adalah 115.18 Da. Namun begitu, jarak pergeseran *backbone* pada wilayahnya justru lebih besar dibanding residu 147, yakni sebesar 2.23 Å. Mutasi Valin menjadi Isoleusin ataupun sebaliknya Isoleusin menjadi Valin pada posisi lain dalam permodelan ini tidak menyebabkan pergeseran *backbone* yang cukup besar apabila dibandingkan dengan yang terjadi pada residu 149 ini.

Oleh karena itu, dugaan penyebab bergesernya *backbone* pada residu 149 diduga mendapat dukungan dari dua faktor utama. Faktor yang pertama, adalah karena adanya interaksi intermolekuler residu ini dengan air berkaitan dengan indeks hidrofobisitas yang bertambah senilai 0.3 membuat wilayah di sekitarnya semakin hidrofobik. Sedangkan faktor yang kedua adalah karena interaksi interatomik yang terjadi pada wilayah aktif yang berbeda kekuatan antara NA-SA HPAI dengan NA-SA LPAI yang kemungkinan besar saling mempengaruhi satu sama lain.

Mutasi pada asam amino 147 dan 149 NA mempunyai kemungkinan berkontribusi memberikan pengaruh tertentu pada kestabilan ikatan NA-SA karena posisinya yang tidak jauh dari residu Asp151 dan Arg152. Hal tersebut juga didukung oleh adanya pergeseran *backbone* yang cukup besar pada keduanya yang juga menyebabkan perubahan struktur konformasi lokal yang berada di sekitarnya (lihat gambar 5.25).

### 3. R172K



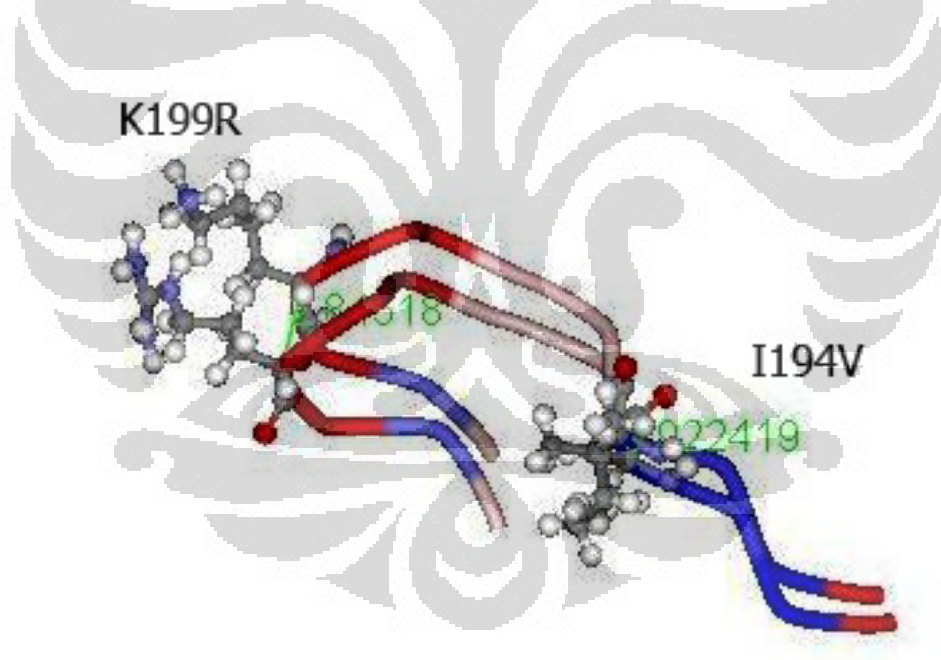
Gambar 5.26: Fitting Mutasi Residu 172 NA LPAI-HPAI



Mutasi Arginin menjadi Lisin pada asam amino urutan 172 NA mengubah berat molekul residu dari 159.21 Da menjadi 131.20 Da dan mengurangi jumlah atom dari 24 menjadi 22 atom. Perubahan indeks hidrofobisitas yang terjadi hanya sedikit dari -4.5 menjadi -3.9 dapat dianggap tidak merubah tingkat hidrofilik wilayah sekitar residu.

Polaritas keduanya yang sama-sama polar dan rantai sampingnya yang sama-sama positif tampaknya menyebabkan *backbone* di wilayah ini tidak banyak berubah meskipun seperti yang terlihat pada gambar 5.26 bahwa *backbone* pada residu-residu di samping residu 172 mengalami perubahan konformasi yang cukup signifikan akibat interaksi interatomik satu sama lain. Hasil pengukuran pada akhir simulasi diketahui pergeseran *backbone*, yang dihitung dari jarak antar C $\alpha$  residu 172 HPAI-LPAI, hanya sebesar 0.86269 Å.

#### 4. I194V dan K199R



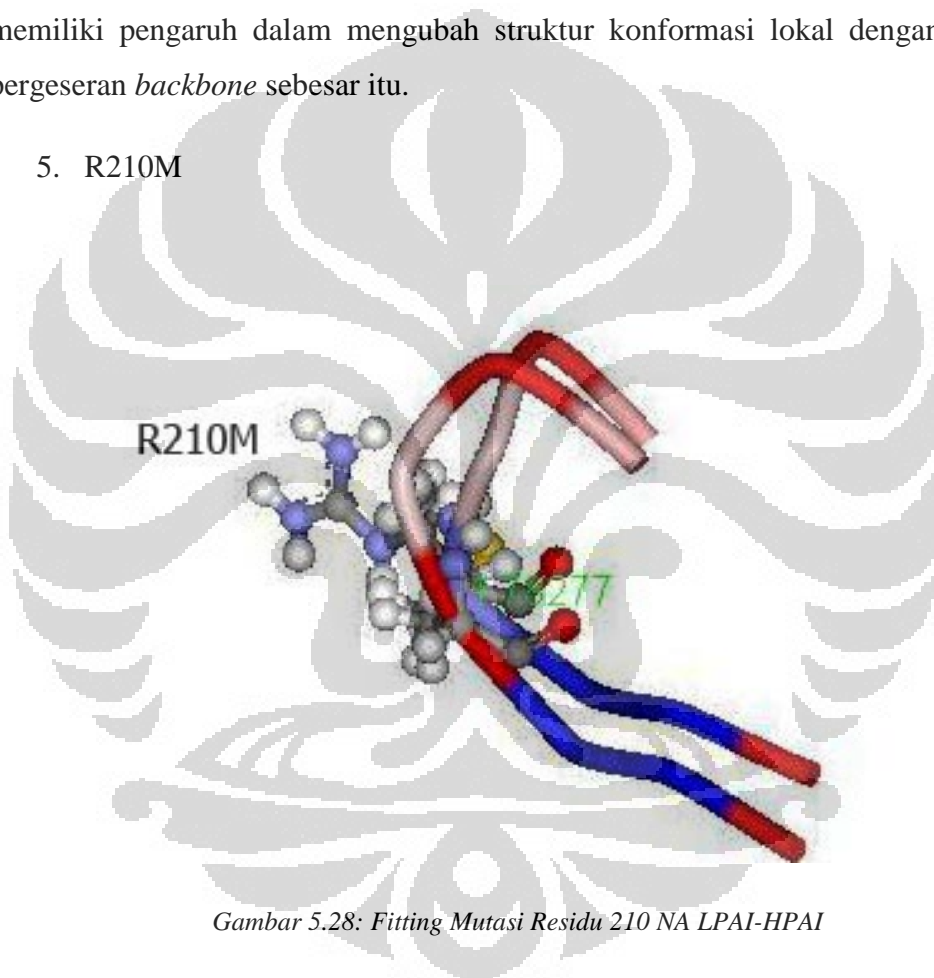
Gambar 5.27: Fitting Mutasi Residu 194 dan 199 NA LPAI-HPAI

Pada 194, asam amino Isoleusin digantikan dengan Valin. Keduanya memiliki polaritas dan muatan rantai samping serupa seperti yang telah disebutkan pada mutasi V149I. Meskipun begitu, pergeseran *backbone* di wilayah ini tidak signifikan. Yakni, hanya sebesar 0.92 Å yang mungkin diakibatkan

adanya interaksi dengan molekul air di sekitar residu. Tidak seperti mutasi pada asam amino urutan 149, tidak terjadi perubahan konformasi struktur lokal yang esensial pada residu ini.

Berbeda dengan mutasi yang dialami residu urutan 194, residu urutan 199, asam amino Lisin yang berubah menjadi Arginin menyebabkan *backbone* mengalami pergeseran cukup besar, sejauh 2.85 Å, meskipun memiliki sifat yang hampir serupa seperti yang telah disebutkan pada mutasi R172K. Mutasi K199R memiliki pengaruh dalam mengubah struktur konformasi lokal dengan adanya pergeseran *backbone* sebesar itu.

#### 5. R210M

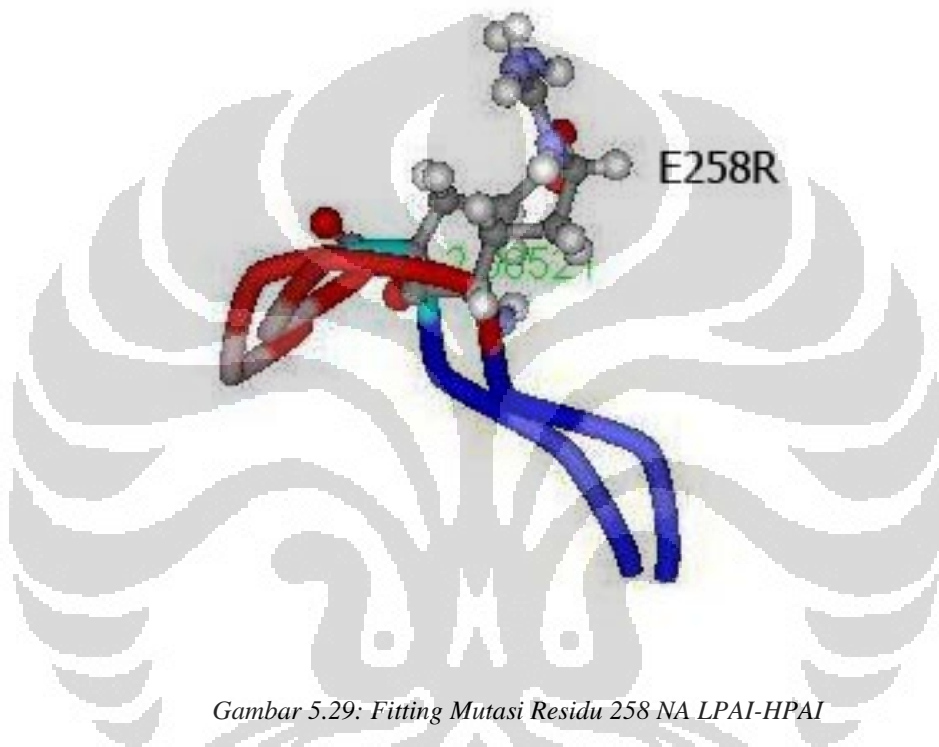


Gambar 5.28: Fitting Mutasi Residu 210 NA LPAI-HPAI

Pada 210, terjadi perubahan asam amino dari Arginin yang bersifat polar menjadi Metionin yang bersifat nonpolar yang tentu akan mempengaruhi interaksinya dengan molekul-molekul air. Dengan muatan pada rantai samping yang juga berubah dari positif menjadi netral ditambah perubahan drastis dari hidrofilik menjadi hidrofobik, *backbone* pada wilayah ini bergeser sejauh 1.78 Å pada akhir simulasi. Secara lokal, mutasi pada asam amino urutan 210 ini memiliki pengaruh cukup signifikan. Hal ini disebabkan mutasi pada residu ini

mengubah sifat polaritas, hidrofobisitas dan muatan rantai sampingnya sekaligus. Namun apabila dilihat dari jaraknya yang jauh dari residu-residu yang dikategorikan sebagai wilayah aktif, mutasi R210M ini dapat diabaikan keberadaannya dalam berkontribusi “mengganggu” stabilitas ikatan hidrogen kompleks NA-SA.

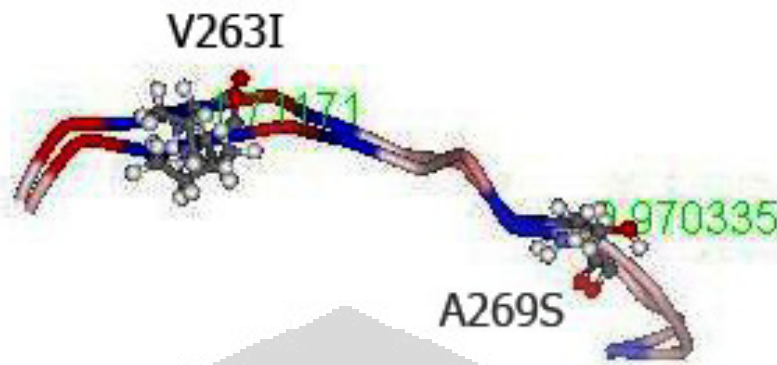
#### 6. E258R



Gambar 5.29: Fitting Mutasi Residu 258 NA LPAI-HPAI

Pada 258, keberadaan residu Glutamat yang memiliki berat molekul 130.13 Da digantikan dengan Arginin yang memiliki berat molekul 159.21 Da telah menyebabkan perubahan muatan rantai samping dari negatif menjadi positif. Hal tersebut menyebabkan perubahan besar terhadap interaksi atomik residu dengan sekelilingnya. Ini dapat diamati dari pergeseran *backbone* yang terjadi di wilayah tersebut yang diketahui sebesar 2.60521 Å sebagai akibat sedikit tertekuknya *backbone* model LPAI pada akhir simulasi yang dibandingkan dengan *template* HPAI. Meskipun perubahan struktur konformasi lokal yang terjadi cukup signifikan, karena posisinya yang jauh dari residu fungsional menjadikan perubahan struktur konformasi lokal yang terjadi di sekitar residu ini tidak dianggap penting dalam mempengaruhi kestabilan ikatan hidrogen NA-SA.

## 7. V263I dan A269S



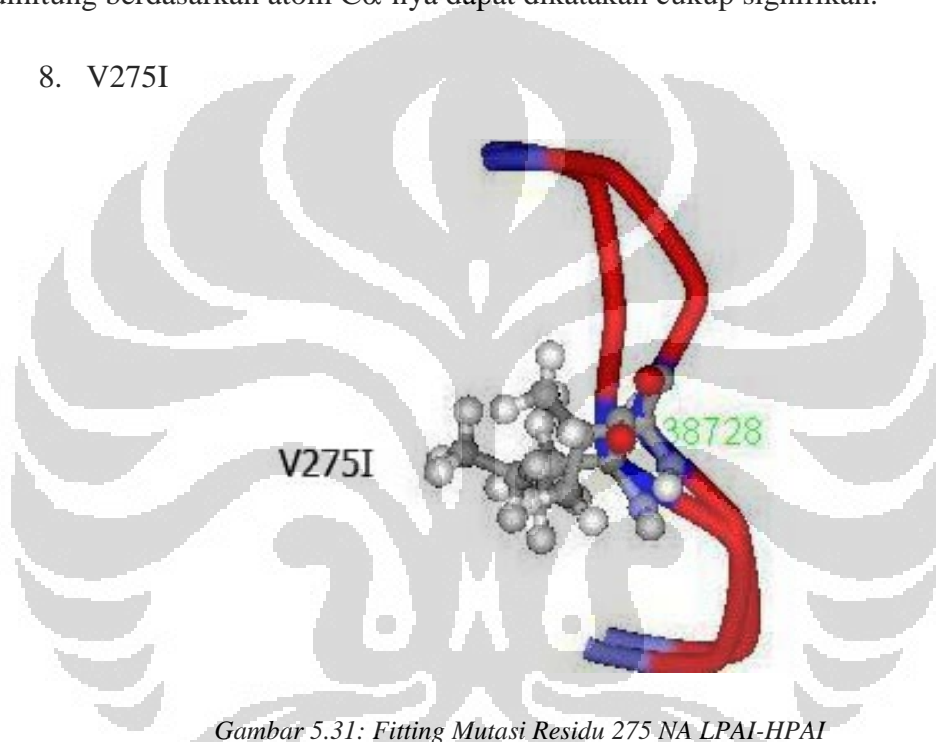
Gambar 5.30: Fitting Mutasi Residu 263 dan 269 NA LPAI-HPAI

Mutasi yang terjadi pada asam amino urutan 263 telah mengubah Valin menjadi Isoleusin. Seperti yang telah dibahas sebelumnya pada mutasi V194I, perubahan Valin menjadi Isoleusin hanya menyebabkan perubahan hidrophobisitasnya saja yang bertambah dari 4.2 menjadi 4.5. Pada gambar 5.30 terlihat bahwa mutasi V263I tak berhasil mempengaruhi kestabilan *backbone* pada residu-residu dalam radius 3.5-4 Å di sekitarnya. Wilayahnya yang juga cukup jauh dari residu-residu fungsional, membuat pergeseran *backbone* pada wilayah ini yang sebesar 1.71 Å dapat dikatakan tidak memiliki pengaruh dalam interaksi interatomik wilayah aktif NA dengan SA.

Mutasi yang terjadi pada asam amino urutan 269 mengubah Alanin yang memiliki sifat nonpolar menjadi Serin yang memiliki sifat polar, membuat kemungkinan terjadinya perubahan konformasi lokal menjadi cukup besar. Akan tetapi, mutasi yang juga diikuti dengan perubahan hidrophobisitas (dari asam amino hidrofobik dengan indeks hidropathy 1.8 menjadi asam amino hidrofilik dengan indeks hidropathy -0.8) dan perubahan berat molekul dari 73.10 Da menjadi 89.10 Da tersebut ternyata tidak menyebabkan banyak perubahan dalam struktur konformasinya. Hal tersebut terlihat dari pergeseran *backbone* di akhir simulasi yang terlihat tak begitu jauh. Hasil pengukuran jarak antar atom Ca residu 269 pada LPAI dan HPAI diketahui hanya sebesar 0.97 Å saja.

Pada gambar 5.30 juga terlihat tak terjadi perubahan konformasi lokal yang signifikan terhadap struktur di sekitar residu 263 dan 269. Meskipun sebenarnya mutasi pada kedua residu ini terletak tidak terlalu jauh dari residu fungsional Glu276, namun sepertinya mutasi V263I dan A269S tak memiliki dampak yang signifikan untuk mempengaruhi ikatan Glu276. Hal ini dapat dipastikan pula dengan melihat konformasi lokal disekitar mutasi yang tak mengalami banyak perubahan meskipun pergeseran *backbone* kedua residu yang dihitung berdasarkan atom C $\alpha$ -nya dapat dikatakan cukup signifikan.

#### 8. V275I

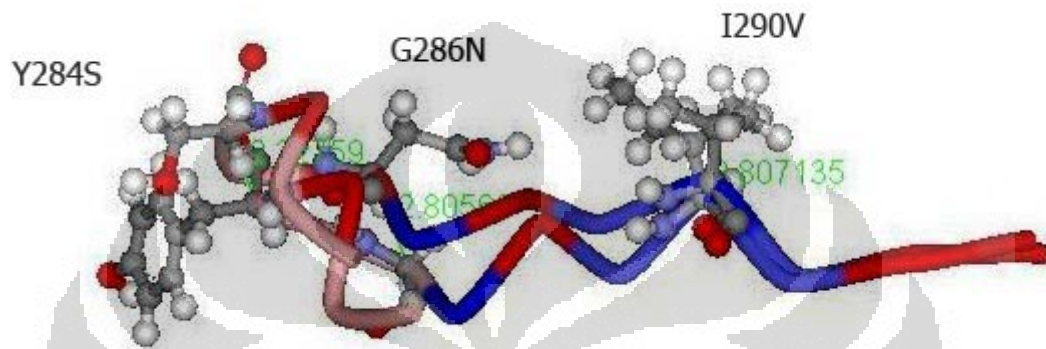


Gambar 5.31: Fitting Mutasi Residu 275 NA LPAI-HPAI

Perubahan asam amino pada urutan 275 NA dari Valin menjadi Isoleusin memang tak mengubah banyak sifat residu kecuali sedikit saja pada hidrophobisitas residu ini. Namun, letaknya yang berdampingan dengan dengan Glu276 yang merupakan salah satu residu fungsional penting dengan kestabilan okupansi tinggi dan energi interaksi yang cukup besar pada NA HPAI menjadi alasan kenapa mutasi di wilayah ini dijadikan salah satu penyebab berkurangnya tingkat kestabilan ikatan hidrogen Glu276-SA pada NA LPAI. Pergeseran *backbone* pada wilayah residu ini yang sebesar 1.39 Å memang tak sebesar pergeseran *backbone* akibat mutasi V149I, namun bertambahnya tiga atom pada suatu wilayah tentu saja dapat mengalami perubahan berbeda bergantung pada wilayah tempatnya berada karena interaksi interatomik berbanding terbalik

dengan kuadrat jaraknya. Oleh sebab itu, perubahan kecil yang terjadi di dekat residu fungsional akan memiliki kontribusi lebih besar dalam mempengaruhi kestabilan ikatan residu fungsional tersebut dibandingkan dengan perubahan cukup besar yang berada jauh darinya.

#### 9. Y284S, G286N dan I290V



Gambar 5.32: Fitting Mutasi Residu 284, 286 dan 290 NA LPAI-HPAI

Mutasi di dua (residu 284 dan 286) dari ketiga urutan ini bisa jadi merupakan salah satu penyebab berkurangnya energi interaksi total kompleks NA-SA dari HPAI menjadi LPAI. Hal ini mengacu pada posisi residu yang berdekatan dengan dua residu fungsional sekaligus. Yakni Glu276 dan Arg292.

Pada 284, mutasi Tirosin yang memiliki berat molekul yang cukup jauh lebih besar 165.19 Da dibandingkan Serin 89.10 Da karena mengalami pengurangan atom sebanyak 10 atom memang hanya mengubah sifat hidrofobisitasnya saja dari -1.3 menjadi -0.8 tanpa mengubah sifat polaritas dan muatan rantai sampingnya. Namun karena dalam permodelan ini kompleks NA-SA virus dimasukkan ke dalam suatu kotak air, perubahan indeks hidropathy sekecil apapun dapat memberikan pengaruh besar. Hal tersebut terlihat pula pada mutasi Y284S di mana pergeseran *backbone* sejauh 2.23 Å cukup mampu mempengaruhi konformasi residu fungsional di dekatnya yang menunjukkan perubahan interaksi interatomik seperti terlihat pada gambar 5.32.

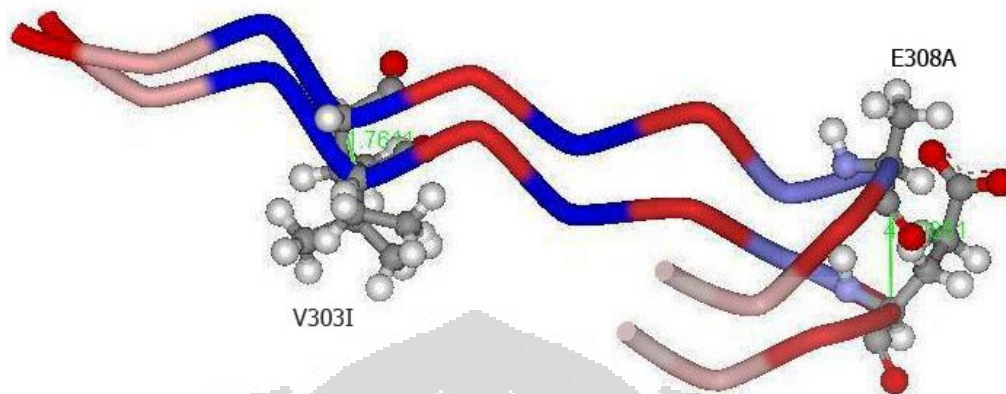


Pada 286, perubahan Glisin yang bersifat nonpolar menjadi Aspargin yang bersifat polar serta perubahan hidrophobisitasnya dari -0.4 menjadi -3.5 dapat membuat perubahan signifikan pada residu-residu fungsional di sekitarnya. Bertambahnya berat molekul residu yang awalnya hanya 59.07 Da menjadi 116.12 Da disebabkan karena bertambahnya jumlah atom diduga juga memberikan kontribusi terjadinya pergeseran *backbone* residu sejauh 2.81 Å. Dari mutasi ini semakin terlihat jelas bahwa perubahan hidrophobisitas memiliki pengaruh besar dalam mengubah konformasi lokal sebagai konsekuensi memasukkan model kompleks NA-SA ke dalam air.

Pada 290, perubahan Isoleusin menjadi Valin hanya merubah hidrophobisitasnya saja dari 4.5 menjadi 4.2. Pergeseran *backbone* sejauh 0.81 Å (tidak jauh berbeda dari hasil penghitungan pergeseran *backbone* pada mutasi I194V) juga tak dapat diabaikan kemungkinan peran dan kontribusinya yang besar terhadap ketidakstabilan residu fungsional. Terutama Arg292 yang posisinya hanya dipisahkan satu residu disamping asam amino urutan 290.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat lebih dalam mutasi yang mana dari ketiga residu termutasi tersebut yang benar-benar memiliki pengaruh besar dalam mengubah konformasi lokal di sekitarnya. Penelitian lanjutan yang menghubungkan mutasi residu di dekat Glu276 dan Arg292 sangat penting mengingat fakta bahwa hanya dua dari ketiga mutasi tersebut yang mengalami pergerakan dan perubahan struktur yang benar-benar signifikan pada LPAI yang memungkinkan terjadinya ketidakstabilan ikatan residu fungsional terdekatnya dan bahkan meniadakan sama sekali ikatan hidrogen Arg292. Meskipun sebenarnya perubahan kecil seperti pada I290V yang merupakan mutasi yang berada paling dekat dengan Arg292 tetap tak boleh diabaikan.

## 10. V303I dan E308A



Gambar 5.33: Fitting Mutasi Residu 303 dan 308 NA LPAI-HPAI

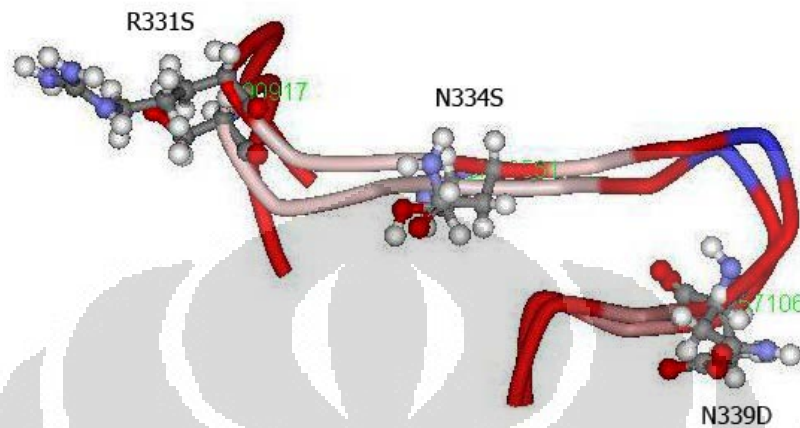
Seperti mutasi Valin menjadi Isoleusin lainnya, perubahan pada asam amino urutan 303, sebenarnya tak banyak menyebabkan perubahan konformasi struktur karena dianggap tak banyak terjadi perubahan sifat residu yang digantikan. Pergeseran *backbone* di wilayah tersebut yang sebesar 1.76 Å diperkirakan sebagai akibat perubahan konformasi signifikan residu 308 yang berubah dari Glutamat menjadi Alanin. Perubahan tersebut mengubah sifat polaritas residu dari polar menjadi nonpolar, dari hidrofilik menjadi hidrofobik dan dari negatif menjadi netral. Penggantian residu yang menyebabkan perubahan hampir seluruh sifat asam amino yang dapat diamati tentu saja dapat mempengaruhi interaksinya baik dengan residu-residu lain di sekitarnya juga dengan molekul-molekul air. Pada akhir simulasi, pergeseran *backbone* di wilayah residu 308 yang diukur antara model kompleks NA-SA HPAI dan LPAI adalah sebesar 4.11 Å sebagai akibat perubahan sifat yang terjadi.

Pengurangan atom sebanyak 5 atom karena Glutamat yang diketahui memiliki berat molekul 130.13 Da pada 308 digantikan dengan Alanin yang memiliki berat molekul 73.10 Da telah membuat perubahan struktur konformasi lokal yang sangat signifikan. Pada gambar 5.33 terlihat dengan jelas bahwa berkurangnya atom telah membuat *backbone* di sekitar residu yang dimaksud telah melakukan penyesuaian besar-besaran karena interaksi interatomik yang mengalami perubahan orientasi. Letak wilayah mutasi E308A yang berada di



lakukan *backbone* turut menambah kemampuan mutasi residu ini dalam mempengaruhi struktur konformasi lokal di sekitarnya.

#### 11. R331S, N334S dan N339D



Gambar 5.34: Fitting Mutasi Residu 331, 334 dan 339 NA LPAl-HPAI

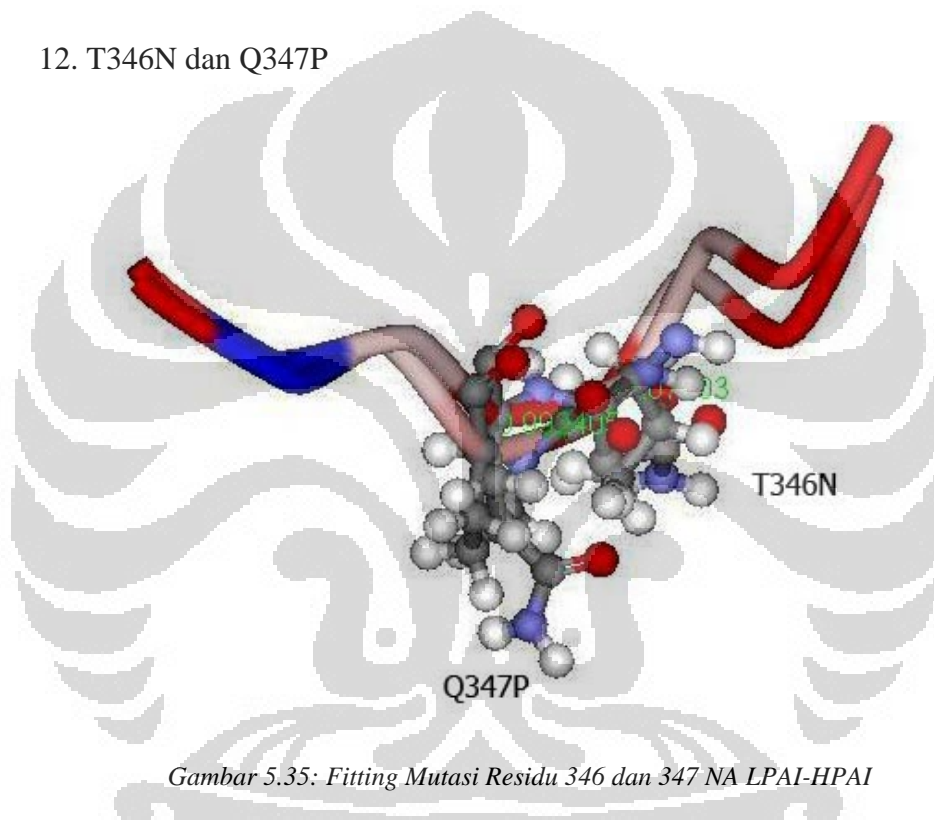
Perubahan asam amino Arginin yang rantai sampingnya positif menjadi asam amino Serin yang rantai sampingnya bermuatan netral pada residu urutan 331 serta termutasinya asam amino Asparagin pada urutan 334 menjadi asam amino Serin menyebabkan berkurangnya sifat hidrofilik di wilayah tersebut. Hal tersebut ditandai dengan bertambahnya indeks hidropathy dari -4.5 menjadi -0.8 pada mutasi R331S dan dari -3.5 menjadi -0.8 pada mutasi N334S. Mutasi pada dua posisi asam amino ini telah menambah deret Serin di wilayah tersebut. Deret Serin kini mengisi dari 331 hingga 335 dan menciptakan pergeseran posisi *backbone* di sepanjang deretnya. Dari hasil penghitungan, diketahui besar pergeseran *backbone* pada asam amino urutan 331 dan 334 adalah sebesar 1.91 Å dan 1.64 Å.

Mutasi N339D mengubah asam amino Asparagin yang bermuatan rantai samping netral menjadi asam amino Aspartat yang bermuatan rantai samping negatif. Ini membuat residu pada wilayah ini memiliki tambahan kemungkinan untuk mempengaruhi struktur konformasi lokal di sekitarnya. Berat molekul keduanya nyaris sama. Yakni bernilai sekitar 116 Da. Meskipun begitu

pergerakan residu yang berbeda menyebabkan pergeseran *backbone* di wilayah residu ini menjadi sebesar 1.57 Å.

Mutasi R331S, N334S dan N339D memang mengalami perubahan struktur konformasi lokal cukup besar. Terutama pada deret Serin dari urutan 331-335. Namun jaraknya yang terbilang jauh dari wilayah aktif, membuat mutasi-mutasi ini dapat dianggap tak memiliki pengaruh besar dalam mengganggu stabilitas ikatan NA-SA hasil mutasi *template* (LPAI).

#### 12. T346N dan Q347P

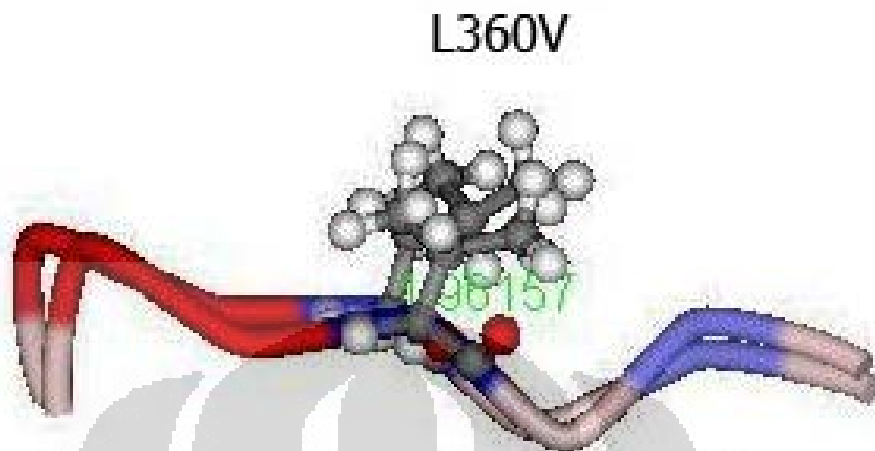


Gambar 5.35: Fitting Mutasi Residu 346 dan 347 NA LPAI-HPAI

Mutasi T346N mengubah sifat hidrofilik asam amino karena perubahan indeks hidrophaty dari -0.7 menjadi -3.5. Threonin yang memiliki berat molekul 103.12 Da berubah menjadi Aspargin yang memiliki berat molekul 116.12 Da telah membuat pergeseran *backbone* sebesar 1.08 Å. Sedangkan mutasi Q347P yang mengubah sifat polaritas dari polar menjadi nonpolar dan perubahan indeks hidrophaty dari -3.5 menjadi -1.6 telah membuat *backbone* bergeser 0.99 Å.

Dari gambar 5.35 terlihat bahwa mutasi yang terjadi pada kedua wilayah ini tidak berpengaruh banyak terhadap struktur konformasi lokal di sekitarnya. Hanya sedikit terjadi pada lekukan *backbone* di wilayah asam amino 344.

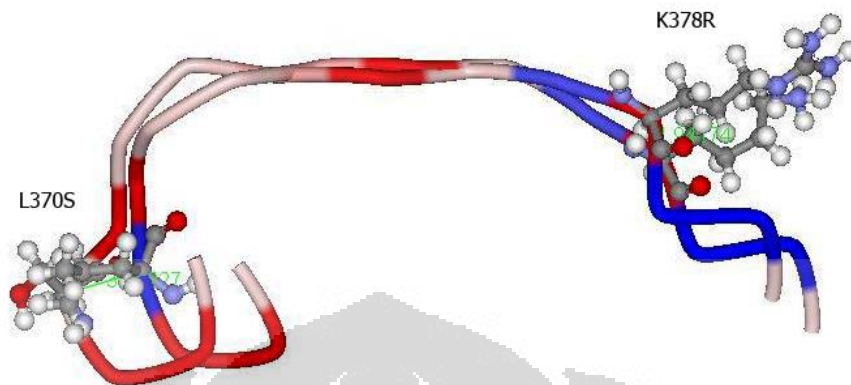
### 13. L360V



Gambar 5.36: Fitting Mutasi Residu 360 NA LPAI-HPAI

Mutasi asam amino Leusin yang memiliki berat molekul 115.18 Da menjadi asam amino Valin dengan berat molekul 101.15 Da seperti terlihat pada gambar 5.36 tak banyak membuat perubahan struktur konformasi di sekitarnya. Namun begitu, terlihat bahwa bertambahnya sifat hidrophobik asam amino 360 ini mampu menggeser *backbone* sejauh 1.96 Å. Karena perubahan tingkat hidrophobisitas akan menyebabkan perbedaan interaksi residu yang termutasi dengan molekul-molekul air yang melingkupi kompleks NA-SA. Penggantian asam amino pada urutan 360 ini juga tidak memiliki pengaruh terhadap kestabilan ikatan kompleks NA-SA karena letaknya yang jauh dari wilayah residu fungsional NA.

#### 14. L370S dan K378R

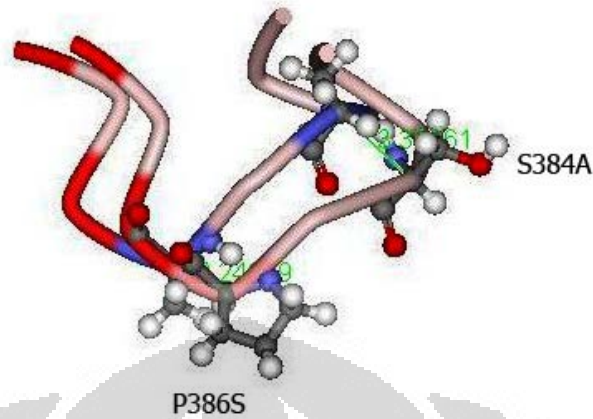


Gambar 5.37: Fitting Mutasi Residu 370 dan 378 NA LPAI-HPAI

Mutasi L370S menjadi mutasi paling krusial pada model yang digenerasikan. Penggantian Leusin yang bersifat hidrofobik yang memiliki indeks 3.8 menjadi Serin yang bersifat hidrofilik yang memiliki indeks -0.8 telah membengkokkan *backbone* di wilayah lekukan cukup jauh (lihat gambar 5.37). Pergeseran *backbone* yang terukur pun cukup besar. Yakni senilai 3.05 Å. Mutasi yang merubah residu nonpolar menjadi polar tersebut telah menjauhkan jarak Arg371 dari substrat SA pada LPAI sehingga ikatan hidrogennya menjadi tidak stabil. Bahkan pada awal simulasi ikatan hidrogen keduanya tidak terbentuk. Padahal pada ikatan hidrogen tersebut sangat penting dalam menginisiasi interaksi bersama-sama Arg118 dan Arg292.

Mutasi asam amino urutan 378 yang mengubah Lisin menjadi Arginin telah menyebabkan pergeseran *backbone* sejauh 1.94 Å. Sama seperti L370S, mutasi K378R mempunyai kemampuan mengubah struktur konformasi lokal seperti terlihat pada gambar 5.37. Kedua mutasi ini memiliki peran penting dalam merusak stabilitas ikatan hidrogen yang dibentuk Arg371 selama simulasi.

## 15. S384A dan P386S



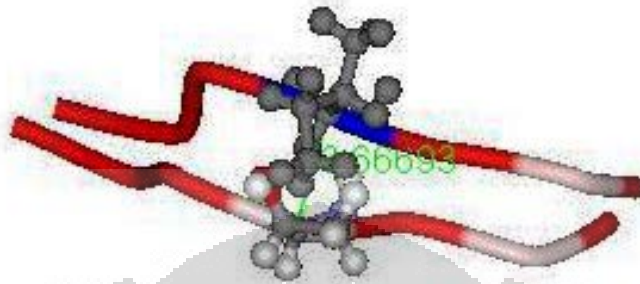
Gambar 5.38: Fitting Mutasi Residu 384 dan 386 NA LPAI-HPAI

Penggantian Serin yang berat molekulnya 89.10 Da menjadi Alanin yang berat molekulnya 73.10 Da telah membuat sifat polaritas asam amino urutan 384 berubah dari polar menjadi nonpolar. Hal tersebut mengubah orientasi interaksi residu karena asam amino polar hanya tertarik dengan polar dan yang nonpolar hanya tertarik dengan nonpolar. Selain itu, sifat hidrofilik Serin yang memiliki indeks hidropathy -0.8 yang digantikan sifat hidrofobik Alanin dengan indeks hidropathy 1.8 memicu terjadinya pergeseran *backbone* sejauh 3.40 Å. Bila dibandingkan dengan mutasi A269S, dapat ditarik kesimpulan bahwa sifat residu yang termutasi dan yang memutasikan tidak sendirian dalam menciptakan pergeseran *backbone* yang cukup jauh ini. Selain hidrofobisitas, diduga letak dan posisi residu termutasi yang berada di lekukan *backbone*-lah, yang membuat lekukan tersebut sedikit tertekuk.

Berkebalikan dengan mutasi S384A, mutasi P386S mengubah asam amino nonpolar Prolin yang memiliki berat molekul 99.13 Da menjadi asam amino polar Serin yang memiliki berat molekul lebih rendah, 73.10 Da. Penggantian asam amino di posisi 386 juga diketahui telah mengurangi sifat hidrofilik wilayah tersebut. Hal tersebut menyebabkan terjadinya pergeseran *backbone* sebesar 2.25 Å.

## 16. I392T

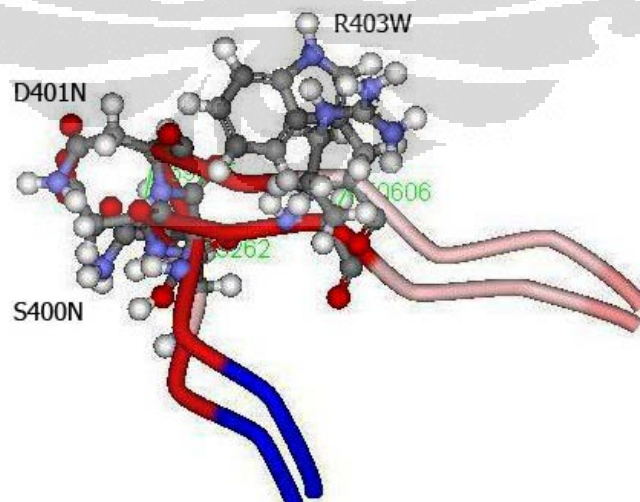
### I392T



Gambar 5.39: Fitting Mutasi Residu 392 NA LPAI-HPAI

Pada asam amino urutan 392, Isoleusin yang nonpolar digantikan dengan Threonin yang bersifat polar. Mutasi I392T ini menghasilkan perubahan struktur konformasi lokal yang cukup besar. Terlihat dari pergeseran atom  $C\alpha$  yang sebesar 3.67 Å. Dari gambar 5.23 terlihat bahwa perubahan drastis dari residu hidrofobik dengan indeks hidropathy 4.5 menjadi hidrofilik dengan indeks hidropathy -0.7 membuat *backbone* menjadi kehilangan linieritasnya karena residu menjadi lebih banyak berinteraksi dengan air di sekitarnya.

## 17. S400N, D401N dan R403W



Gambar 5.40: Fitting Mutasi Residu 400, 401 dan 403 NA LPAI-HPAI

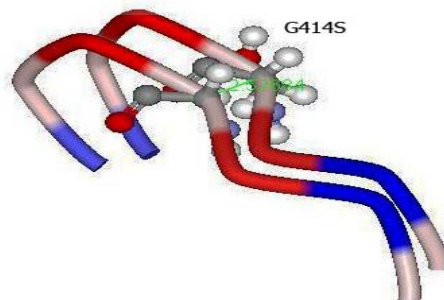


Mutasi di ketiga wilayah ini diduga kuat memiliki keterlibatan dalam membuat Tyr406 yang hanya berperan menjadi residu *framework* pada HPAI berubah peran menjadi residu fungsional pada LPAI meskipun kontribusi ikatan hidrogennya selama simulasi tidak besar yang terlihat dari kestabilan ikatannya (lihat gambar 5.23). Hal tersebut disebabkan mutasi pada ketiga posisi ini membuat *backbone* pada Tyr406 bergeser mendekati substrat sebagai akibat bergesernya *backbone* di ketiga posisi ini.

Pada mutasi S400N, Asparagin yang memiliki sifat hidrofilik lebih kuat menggantikan Serin. Mutasi ini mengakibatkan pergeseran *backbone* sebesar 2.33 Å dan mengubah struktur konformasi lokal secara signifikan bersama-sama dengan mutasi D401N yang *backbone*-nya juga telah bergeser tidak terlalu berbeda jauh jarak pergeserannya, 2.60 Å. Mutasi D401N yang berkebalikan dengan mutasi N339D hanya mengubah muatan rantai sampingnya saja dari netral menjadi negatif. Namun begitu, bila dibandingkan dengan N339D, pada mutasi D401N terlihat pergeseran *backbone* yang lebih besar. Dapat dipastikan hal tersebut lebih disebabkan oleh karena posisi mutasi yang terletak tepat di lekukan *backbone*.

Pada 403, perubahan dari Arginin (polar) menjadi Triptophan (nonpolar) membuat interaksinya dengan molekul air mengalami perubahan pula. Apalagi Arginin yang bermuatan rantai samping positif memiliki sifat hidrofilik yang lebih kuat daripada Triptophan yang netral. Hal tersebut menyebabkan perubahan posisi akhir atom C $\alpha$  pada kedua residu bergeser sejauh 1.71 Å.

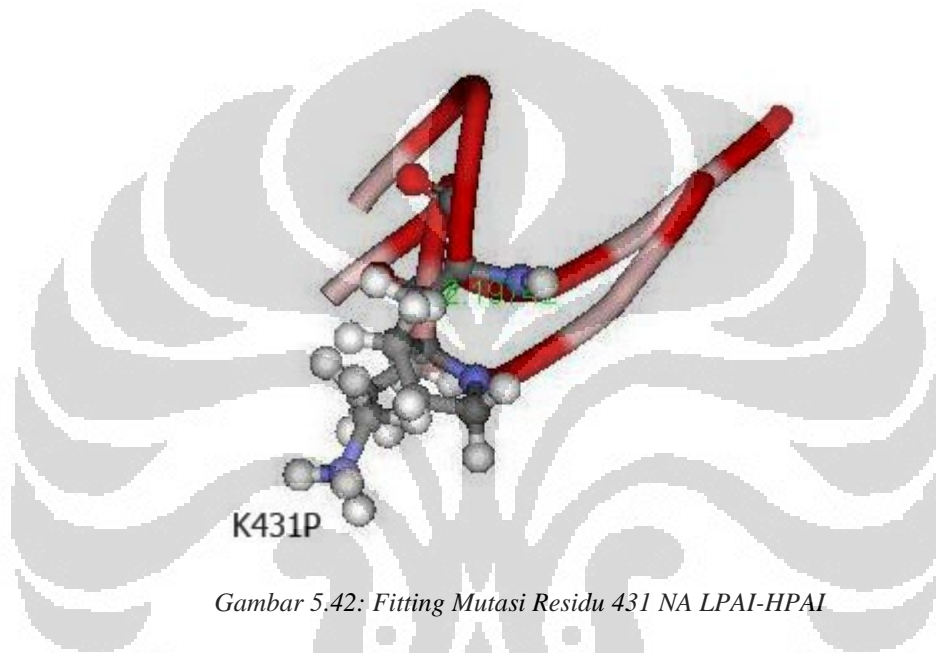
#### 18. G414S



Gambar 5.41: Fitting Mutasi Residu 414 NA LPAI-HPAI

Asam amino nonpolar Glisin pada posisi 414 digantikan dengan Serin yang polar tak menyebabkan perubahan interaksi dengan molekul-molekul air di sekitarnya. Pergeseran *backbone* sebesar 2.53Å hanya memberikan kontribusi dalam mengubah konformasi lokal saja dan tak memiliki peran penting dalam mempengaruhi ikatan NA-SA dilihat dari posisinya yang jauh dari residu-residu fungsional.

#### 19. K431P



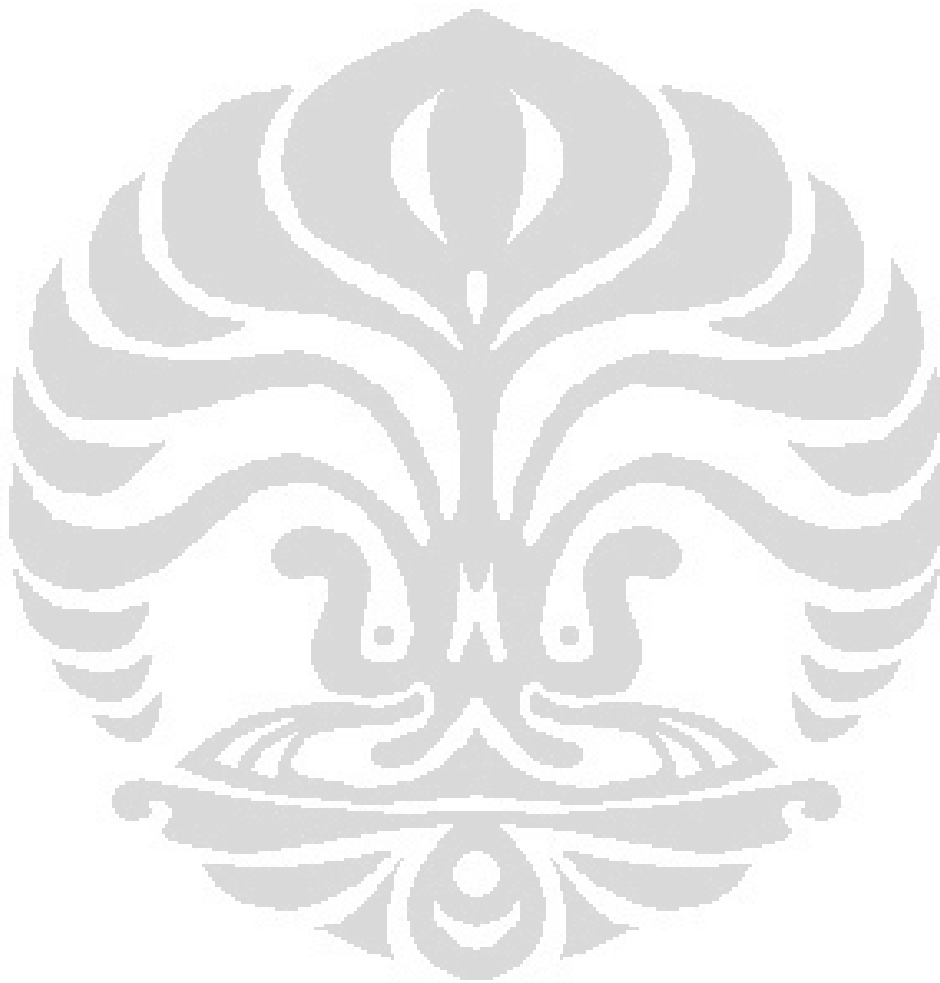
Gambar 5.42: Fitting Mutasi Residu 431 NA LPAI-HPAI

Penggantian posisi Lisin oleh Prolin pada 431 membuat *backbone* bergeser sejauh 2.20 Å di akhir simulasi. Ini dipengaruhi oleh adanya perubahan polaritas dari polar menjadi nonpolar. Seperti yang diketahui perubahan sifat polaritas membuat perubahan interaksi terhadap molekul-molekul air sekitar. Tampaknya perubahan sifat hidrofilik dari yang sangat kuat sifatnya menjadi yang tak terlalu kuat turut mempengaruhi interaksi. Terlihat pada gambar 5.42, struktur konformasi lokal pada akhir simulasi kedua model sangat berbeda. Namun, hal tersebut dapat kita abaikan karena posisinya yang jauh dari residu fungsional.

Berdasarkan analisa, secara lokal, mungkin hanya sejumlah mutasi dalam penelitian ini yang dianggap memiliki peran besar dalam “menggangu” stabilitas ikatan NA-SA di wilayah aktif. Di antaranya adalah mutasi D147G, V149I, I194V, K199R, V275I, I290V, V303I, T346N, Q347P, L370S, S400N, D401N, R403W dan K431P. Namun secara keseluruhan, perubahan sekecil apapun tetap



memiliki andil dalam mempengaruhi kestabilan ikatan dengan mengganggu stabilitas struktur dan konformasinya. Karena perubahan tersebut dapat menyebabkan efek domino yang mampu mengubah *backbone* model yang disimulasikan. Hal tersebut didukung dengan RMSD *all atoms* HPAI yang lebih rendah dari LPAI (lihat gambar 5.8).



## BAB VI

### KESIMPULAN

Dengan membandingkan dua kompleks *neuraminidase-sialic acid* virus influenza unggas dengan tingkat pathogenisitas berbeda menggunakan metode simulasi berbasis mekanika molekular berhasil memperlihatkan adanya hubungan antara pathogenisitas virus dengan struktur ikatan kompleks *neuraminidase* (NA) dengan substrat alaminya (SA). Hal ini terlihat dari lebih stabilnya ikatan kompleks NA-SA HPAI dibanding LPAI selama proses menaikkan temperatur dan sepanjang simulasi pada temperatur ruang. Energi bebas ikatan kompleks NA-SA HPAI sebesar -350.62 kcal/mol menandakan ikatan yang lebih kuat dibandingkan kompleks NA-SA LPAI yang memiliki energi bebas ikatan sebesar -231.59 kcal/mol. Perbedaan besar energi bebas ikatan sebesar 119.03 kcal/mol menjadi acuan kuat-lemahnya ikatan NA-SA dari HPAI dan LPAI [50,51]. Bahkan sebelum disimulasikan, proses minimisasi energi dari kompleks NA-SA HPAI sudah memiliki energi total lebih rendah 111879.65 kcal/mol dibandingkan dengan kompleks NA-SA LPAI. Hal yang berhubungan langsung dengan perbedaan jumlah atom karena 42 mutasi yang terjadi.

Setelah energi bebas ikatan dihitung di akhir simulasi, energi interaksi residu fungsional kemudian dikalkulasi untuk melihat seberapa kuat pengaruh ikatan masing-masing residu fungsional. Hal ini penting untuk melihat spesifikasi residu yang memiliki kontribusi terbaik dalam mengikat substrat secara energetik. Hasil yang didapat diketahui residu Arg371 memiliki energi interaksi ikatan terbesar dengan dua ikatan sekaligus. Sedangkan pada LPAI, Asp151-lah yang memberikan kontribusi ikatan terbesar secara energetik.

Energi ikatan hidrogen yang telah dikalkulasi kemudian dibandingkan dengan kestabilan ikatan hidrogen itu sendiri melalui penghitungan persentase okupansi dan pengukuran jarak ikatan hidrogen. Penghitungan persentase okupansi dan penggambaran grafik jarak ikatan hidrogen selama simulasi berhasil menjelaskan residu-residu yang sangat penting yang berinteraksi secara langsung dengan sialic acid. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa residu-

residu fungsional pada kompleks NA-SA HPAI memiliki kemampuan mengikat substrat lebih baik dan stabil daripada kompleks NA-SA LPAI. Terutama pada wilayah subsite S1 yang memiliki fungsi sebagai inisiator ikatan. Persentase okupansi pada wilayah S1 residu fungsional kompleks NA-SA sangat kontras perbedaan di antara keduanya. Dari data persentase okupansi yang ada dapat disimpulkan bahwa Asp151, Arg 152, Glu276, Arg292 dan Arg371 memiliki peran sangat penting dalam proses pengikatan dan katalisis sialic acid pada virus yang lebih pathogenik.

Usai melihat kemampuan berikatan NA-SA, dicari tahu dari seluruh mutasi apakah memiliki hubungan dengan ketidakstabilan ikatan. Meskipun harus diakui analisis mutasi masih belum menemukan cara terbaik melihat hubungannya dengan ketidakstabilan ikatan NA-SA, hasil yang didapat dengan melihat perubahan konformasi struktur secara langsung sebagai akibat perubahan sifat residu yang termutasi cukup dapat menjelaskan pengaruh mutasi pada sejumlah residu yang berada dekat dengan residu fungsional. Dari 32 mutasi yang diaplikasikan pada *template*, nyaris semuanya memiliki pengaruh terhadap konformasi struktur lokal cukup signifikan. Hal ini disebabkan karena permodelan homologi yang dilakukan turut memperhitungkan perubahan posisi atom-atom dalam radius 3.5 Å dari residu yang dimutasikan. Namun begitu, hanya 14 mutasi saja yang dapat memberikan pengaruh secara langsung terhadap ikatan kompleks NA-SA. Hal tersebut disebabkan letak mutasi yang strategis dan dekat dengan residu fungsional yang berikatan secara langsung dengan sialic acid. Mutasi-mutasi tersebut adalah D147G, V149I, I194V, K199R, V275I, I290V, V303I, T346N, Q347P, L370S, S400N, D401N, R403W dan K431P. Namun perlu penelitian lebih lanjut secara kuantitatif dengan lebih banyak kompleks NA-SA untuk memastikan hal ini.

Simulasi dan kalkulasi yang telah dilakukan berhasil menunjukkan adanya perbedaan kekuatan dan ikatan dan interaksi neuraminidase dengan sialic acid sebagai substrat alaminya. Tingkat kestabilan interaksi yang menjadi bagian penelitian juga berhasil menspesifikasi residu-residu dan subsite utama pada wilayah aktif yang sangat penting perannya dalam mengikat substrat. Dari hasil

membandingkan kekuatan dan kestabilan ikatan hidrogen diketahui bahwa residu Asp151, Arg152, Glu276, Arg292 dan Arg371 merupakan residu fungsional yang berperan penting pada aktivitas enzimatik NA virus influenza unggas dan pathogenisitas virus. Namun, proses katalitik yang terjadi belum dapat dilakukan secara maksimal karena keterbatasan kemampuan sarana komputasi yang digunakan sehingga hanya mampu mensimulasikan interaksi selama 20 ps. Hal ini disebabkan molekul yang dipakai cukup besar` dan juga dalam penelitian ini dilibatkan molekul-molekul air yang banyak. .

Pendekatan dan parameter yang dipakai dalam penelitian ini diakui masih sangat jauh dari kata “serupa” dengan kondisi alami laboratorium. Terutama kestabilan temperatur dan waktu simulasi yang masih perlu diperhatikan lagi. Hal ini bisa jadi memberikan pengaruh besar terhadap kestabilan ikatan kompleks molekul yang dimodelkan. Selain itu, perlu adanya pembandingan dari laboratorium pada penelitian *in vivo* untuk memverifikasi lebih lanjut mengenai kualitas penelitian permodelan ini.

Penelitian lanjut tentang pathogenisitas virus influenza unggas ini sangat perlu dilakukan terutama berdasarkan interaksinya dengan obat. Sebagai pembandingan interaksi dengan substrat alaminya. Sehingga diharapkan suatu saat dapat diketahui mengapa neuraminidase virus influenza unggas resisten terhadap sejumlah obat dan lebih baik dalam mengenali sialic acid. Dengan tujuan akhir disain dan sintesis obat inhibitor berbasis struktur dapat terwujud.

## DAFTAR REFERENSI

1. Varghese J. N. *Development of Neuraminidase Inhibitors as Anti-Influenza Virus Drugs*. DRUG DEVELOPMENT RESEARCH. 1999. 46. p176–196
2. Kamps B. S., and Reyes-Teran G. *Influenza*. Influenza Report. Flying Publisher. 2006. P17-47
3. Harper S. A., Fukuda K., Uyeki T. M. Cox N. J. and Bridges C. B. *Prevention and Control of Influenza: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*.  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm>
4. Reid A. H., Fanning T. G., Hultin J. V., and Taubenberger J. K. *Origin and Evolution of the 1918 'Spanish' Influenza Virus Hemagglutinin Gene*. PNAS. 1999. Vol 96. P1651-1656.
5. Kawaoka Y, Krauss S and Webster R. G. *Avian-to-Human Transmission of the PBI Gene of Influenza A Viruses in the 1957 and 1968 Pandemics*. Journal of Virology. 1989. P4603-4608.
6. Taubenberger J. K., and Morens D. M. *1918 Influenza: the Mother of All Pandemics*. Emerging Infectious Diseases vol 12. 2006. p15-22
7. World Health Organization (WHO). *Avian Influenza: Assessing the Pandemic Threat*. WHO/CDS/2005.29 p.26
8. World Health Organization (WHO). *Avian Influenza: Assessing the Pandemic Threat*. WHO/CDS/2005.29 p.31  
[http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO\\_CDS\\_2005\\_29/en/](http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/)
9. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/avianinfluenza\\_factsheetJan2006/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avianinfluenza_factsheetJan2006/en/index.html)
10. Glezen W. P. *Emerging infections: pandemic influenza*. Epidemiol Rev 1996. P 1-13
11. Behrens G. and Stoll M. *Pathogenesis and Immunology*. Influenza Report. Flying Publisher. 2006. p. 92-106
12. Zhou J., Sun W., Wang J., Guo J., Yin W., Wu N., Li L., Yan Y., Huang Y., Luo K., Jiang X. and Chen H. *Characterization of the H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus derived from Wild Pikas in China..* 2009. J. Virol. doi:10.1128/JVI.00793-09
13. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y: *Molecular basis for the generation in pigs of*

- influenza A viruses with pandemic potential. J Virol* 1998/08/08 edition. 1998, 72(9):7367-7373.
14. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/Flu/understandingFlu/definitionsOverview.htm>
  15. Itzstein, M. v.; Barry, J. G.; Chong, A. K. *The Development of Potential Anti-influenza Drugs. Curr. Opin. Ther. Patents* 1993, 3, 1755
  16. Bramford, M. *Neuraminidase Inhibitors as Potential Anti-Influenza Drugs. J. Enzyme Inhib.* 1995, 10, 1-16
  17. Gurtler, L. *Virology of Human Influenza. Influenza Report. Flying Publisher.* 2006. p. 87-109
  18. Gong J., Xu W., and Zhang J. *Structure and Functions of Influenza Virus Neuraminidase. Current Medicinal Chemistry,* 2007
  19. Fouchier R. A. M, Munster V., Wallensten A., Bestebroer T. M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B., and Osterhaus A. D. M. E. *Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black Headed Gulls. Journal of Virology.* 2004. p. 2814-2822
  20. Nicholls J M, Bourne A J, Chen H, Guan Y, Peiris JSM. *Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract:evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. Biomed Central.* 2007
  21. Whittaker G, Bui M, Helenius A. *The role of nuclear import and export in influenza virus.*
  22. Wang G T, Chen Y, Wang S, Gentles R, Sowin T, Kati W et all. *Design, Synthesis, and Structural Analysis of Influenza Neuraminidase Inhibitors Containing Pyrrolidine Cores. J. Med. Chem.* 2001, 44,p 1192-1201
  23. Garman E., Laver G. *The Structure, Function and Inhibitors. Trends Cell Biol.* 1996. p.67-71
  24. Milanese L. *Comparative Ligand Binding of Neuraminidase Structures.*
  25. Amaro R. E., Cheng X., Ivanov I., Xu Dong and McCammon J. A. *Characterizing Loop Dynamics and Ligand Recognition in Human-and Avian-Type Influenza Neuraminidases via Generaslized Born Molecular Dynamics and End-Point Free Energy Calculations. JACS Article.* 2009.
  26. U.S. Fish & Wildlife Service Highly Pathogenic Avian Influenza. *Understanding and Protection*
  27. World Organization for Animal Health, Chapter 2.7.12, *Avian Influenza in Manual of*

- Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (2004), (2005)  
[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00037.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm)
28. Swayne, D. E. and Suarez, D. L. *Highly pathogenic avian influenza*. Rev. Sci. Tech. (2000) 19, 463–482
  29. Wang T. and Wade R. C. *Comparative Binding Energy (COMBINE) Analysis of Influenza Neuraminidase-Inhibitors Complexes*. J. Med. Chem. 2001, 44. 961-971
  30. Von Itzstein M. *The War Against Influenza: discovery and development of sialidase inhibitors*. Nature Publishing Group. 2007. Vol. 6:967-974.
  31. Couceiro J. N. S. S. and Baum L. G. *Characterization of the Hemagglutinin Receptor Specificity and Neuraminidase Substrate Specificity of Clinical Isolates of Human Influenza A Viruses*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994. Vol. 89(4): 587-591.
  32. Suarez, D. L. *Influenza A Virus*. Blackwell Pub. 2008. p.3-22
  33. Liu, C., Eichelberger, M. C., Compans, R. W., and Air, G. M. *Influenza Type A Virus Neuraminidase Does Not Play a Role in Viral Entry, Replication, Assembly, or Budding*. Journal of Virology. 1995. Vol 69(2):1099-1106.
  34. Nayak D. P., Hui E. K. W. and Barman S. *Assembly and Budding of Influenza Virus* Virus Research. 106 (2004) 147-165
  35. Mitnaul L. J., Matrosovich M. N., Castrucci M. R., Tuzikov A. B., Bovin N. V., Kobasa D. and Kawaoka Y. *Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus*. JOURNAL OF VIROLOGY. 2000. 6015–6020
  36. Banks J., Speidel E. S., Moore E., Plowright L., Piccirillo A., Capua I., Cordioli P., Fioretti A. and Alexander D. J. *Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy*. Arch Virol (2001) 146: 963–973
  37. Hulse D. J., Webster R. G., Russel R. J. and Perez D. R. *Molecular Determinants within the Surface Proteins Involved in the Pathogenicity of H5N1 Influenza Viruses in Chickens*. JOURNAL OF VIROLOGY. 2004. 9954–9964
  38. Rott, R., M. Orlich, and C. Scholtissek. *Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains*. Journal of General Virology. 1979. 44:471–477
  39. Zhou J., Sun W., Wang J., Guo J., Yin W., Wu N., Li L., Yan Y., Huang Y., Luo K., Jiang X. and Chen H. *Characterization of the H5N1 Highly Pathogenic Avian*

- Influenza Virus derived from Wild Pikas in China.* 2009. J. Virol. doi:10.1128/JVI.00793-09
40. Tarigan S., Indriani R. dan Darminto. *Karakterisasi Aktivitas Enzimatis Neuraminidase Virus Influenza H5N1.* 2007. JITV 12(2):153-159
  41. Lee C. W., Suarez D. L., Tumpey T. M., Sung H. W., Kwon Y. K., Lee Y. J., Choi S. J Joh S. J., Kim M. C., Lee E. K., Park J. M., Lu X., Katz J. M., Spackman E., Swayne D. E. and Kim J. H. *Characterization of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Viruses Isolated from South Korea.* JOURNAL OF VIROLOGY. 2005. p. 3692-3702
  42. Peltola V. T., Murti K. G. and McCullers J. A. *The Influenza Virus Neuraminidase Contributes to Secondary Bacterial Pneumonia.* J Infect Dis. 2005; 192(2):249-257
  43. Suzuki T., Takahashi T., Guo C. T., Hidari K. L. P. J., Miyamoto D., Goto H., Kawaoka Y. and Suzuki Y. *Sialidase Activity of Influenza A Virus in an Endocytic Pathway Enhances Viral Replication.* JOURNAL OF VIROLOGY. 2005. p. 11705-11715
  44. Tumpey T. M., Suarez D. L., Perkins L. E. L., Senne D. a., Lee J., Lee Y. J., Mo I. P., Sung H. W. and Swayne D. E. *Characterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat.* JOURNAL OF VIROLOGY. 2002. p. 6344-6355
  45. Spackman E., Swayne D. E., Suarez D. L., Senne D. a., Pedersen J. C., Killian M. L. Pasick J. Handel K., Pillai S. P. S., Lee C. W., Stallknecht D., Slemons R., Ip H. S. and Deliberto T. *Characterization of Low-Pathogenicity H5N1 Avian Influenza Viruses from North America.* JOURNAL OF VIROLOGY. 2007. p. 11612-11619
  46. Zhou H., Yu Zh., Hu Y., Tu J., Zou W., Peng Y., Zhu J., Li Y., Zhang A., Yu Zi., Ye Z., Chen H. and Jin M. *The Special Neuraminidase Stalk-Motif Responsible for Increased Virulence and Pathogenesis of H5N1 Influenza A Virus.* 2009. PLoS ONE 4(7): e6277. doi:10.1371/journal.pone.0006277
  47. Matsuoka Y., Swayne D. E., Thomas C., Rameix-Welti M. A., Naffakh N., Warnes C., Altholtz., Donis R. and Subbarao K. *Neuraminidase Stalk Length and Additional Glycosylation of the Hemagglutinin Influence the Virulence of Influenza H5N1 Viruses for Mice.* 2009. Journal of Virology. 4704-4708.
  48. Kati W. M., Montgomery D., Maring C., Stoll V. S., Giranda V., Chen X., Laver G., Kohlbrenner W. and Norbeck D. W. *Novel  $\square$ - and  $\square$ -Amino Acid Inhibitors of*



- Influenza Virus Neuraminidase. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.* 2001. P 2563-2570
49. Masukawa K. M., Kollman P. A. and Kuntz I. D. *Investigation of Neuraminidase-Substrate Recognition Using Molecular Dynamics and Free Energy Calculations.* J. Med. Chem. 2003. 46, p5628-5637
  50. Guo X. L., Wei D. Q., Zhul Y. S. and Chou K. C. *Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin.* 2008. 35, p375-382
  51. Decha P., Rungrotmongkol T., Intharathep P., Malaisree M., Aruksakunwong O., Laohpongspaisan C., Parasuk V., Sompornpisut P., Pianwanit S., Kokpol S. and Hannongbua S. *Source of High Pathogenicity of an Avian Influenza Virus H5N1: Why H5 Is Better Cleaved by Furin.* Biophysical Journal Volume 95. 2008. p128–134
  52. Aruksakunwong O , Malaisree M., Decha P., Sompornpisut P., Parasuk V., Pianwanit S., and Hannongbua S. *On the Lower Susceptibility of Oseltamivir to Influenza Neuraminidase Subtype N1 than Those in N2 and N9.* Biophysical Journal Volume 92. 2007. p798–807
  53. Wei D. Q., Du Q. Shi., Sun H. and Chou K. C. *Insights from modeling the 3D structure of H5N1 influenza virus neuraminidase and its binding interactions with ligands.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006. 344. p1048–1055
  54. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson T. J. *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acid Research. Oxford University Press 1994. Vol 22(22): 4673-4680.
  55. <http://www.umass.edu/molvis/workshop/homolmod.htm>
  56. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E.,; Olafson, B. D., States, D. J.,; Swaminathan, S. and Karplus, M. *CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations.* J. Comp. Chem. **1983**, 4, 187-217
  57. Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry.* John Wiley & Sons Ltd. England: 1999. p. 1-5
  58. Leach A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications.* 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice Hall. 2001
  59. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
  60. Kaverin N. V., Rudneva I. A., Ilyushina N. A., Varich N. L., Lipatov A. S., Smirnov Y. A., Govorkova E. A., Gitelman A. K., Lvov D. K. and Webster R. G. *Structure of*

*antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants.* Journal of General Virology.2002.83, p2497–2505

61. Pereira, M. S., Chakraverty, P., and Pane, A. R. *The Influence of Antigenic Variation on Influenza A 2 Epidemics.* J. Hyg., Camb. Great Britain 67. 1969, p. 551-557
62. Wang M. Z., Tai C. Y. and Mendel D. B. *Mechanism by Which Mutations at His274 Alter Sensitivity of Influenza A Virus N1 Neuraminidase to Oseltamivir Carboxylate and Zanamivir.* ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 2002, p. 3809–3816
63. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
64. Karplus, M., and McCammon, A. *Molecular dynamics simulations of biomolecules.* Nature Structural Biology. 2002. Vol9(9):646-788.
65. Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenaga, A., Morimoto, G., Yanai, R., Ohno, Y., Narumi, T., and Taiji, M. *High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations.* PLoS Computational Biology. 2009. Vol 5:1-13.
66. Sutmann, G. *Classical Molecular Dynamics.* Quantum Simulations of Complex Many-Body Systems: From Theory to Algorithms.2002. Vol 10: 211-254.
67. Le, L., Lee, E., Schulten, K., and Truong, T. N. *Molecular Modeling of swine influenza A/H1N1, Spanish H1N1, and avian H5N1 flu N1 Neuraminidase bound to Tamiflu and Relenza.* PloS Current Beta. 2009.
68. Van Der Spoel D., Berendsen H. *Determination of Proton Transfer Rate Constants Using Ab Initio, Molecular Dynamics and Density Matrix Evolutional Calculations.*
69. Trylska J., Grochowski P., and McCammon J. A. *The Role of Hydrogen Bonding in The Enzymatic Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease.* Prot Science. 2004. 13: 513-528.
70. McKimm-Breschkin JL, Sahasrabudhe A, Blick TJ, McDonald M, Colman PM, Hart GJ, Bethell RC, Varghese JN. *Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en derivatives.* J Virol. 1998. 72:2456–2462
71. Stoll, V., Stewart, K. D., Maring, C. J., Muchmore, S., Giranda, V., Gu, Y.-g. Y., Wang, G., Chen, Y., Sun, M., Zhao, C., Kennedy, A. L., Madigan, D. L., Xu, Y., Saldivar, A., Kati, W., Laver, G., Sowin, T., Sham, H. L., Greer, J., Kempf, D.

*Influenza Neuraminidase Inhibitors: Structure-Based Design of a Novel Inhibitor*  
*Series.Biochemistry. 2003.42: 718-727.*

