

***HOMOLOGY MODELING, STUDI DOCKING, DAN SIMULASI
DINAMIKA MOLEKULER EPITOP ISOCITRATE
DEHYDROGENASE TIPE 1 (R132H) SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN GLIOMA***

TESIS

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Magister dari
Institut Teknologi Bandung**

**Oleh
YENI
NIM: 20714032
(Program Studi Magister Farmasi)**



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
Oktober 2016**

ABSTRAK

HOMOLOGY MODELING, STUDI DOCKING, DAN SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER EPITOP ISOCITRATE DEHYDROGENASE TIPE 1 (R132H) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN GLIOMA

Oleh
Yeni
NIM: 20714032
(Program Studi Magister Farmasi)

Glioma merupakan jenis tumor otak ganas primer. Adanya glioma dapat ditandai dengan mutasi R132H pada *Isocitrate dehydrogenase* tipe 1 (IDH1). IDH1 (R132H) yang mengandung epitop imunogenik yang spesifik terhadap tumor dan cocok untuk dijadikan vaksin perlu diketahui strukturnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan *homology modeling*, studi *docking* dan simulasi dinamika molekuler epitop IDH1 (R132H). TMHMM, MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 digunakan untuk memprediksi topologi transmembran IDH1 (R132H). Analisis epitop-epitop IDH1 (R132H) dilakukan menggunakan NetMHCII dan IEDB. Epitop-epitop hasil analisis diprediksi antigenisitasnya dengan menggunakan VaxiJen sehingga didapatkan 91 epitop. *Homology modeling* epitop-epitop yang memiliki kemungkinan sebagai antigen dilakukan dengan menggunakan Modeller, I-TASSER dan (PS)². Hasil *homology modeling* epitop-epitop IDH1 (R132H) divalidasi dengan MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. Kemudian dipilih satu model 3D dari tiga model hasil *homology modeling* untuk setiap epitop dan dilakukan *refinement* pada struktur epitop dengan menggunakan GalaxyRefine dan GROMACS untuk minimisasi energi. Epitop di-*docking* terhadap MHC II HLA DRB1 0101 untuk mengetahui fungsi preventif dan terhadap reseptor EphA3 untuk mengetahui fungsi kuratif menggunakan Dock. Epitop 42 memiliki afinitas ikatan yang paling besar dengan MHC II HLA DRB1 0101 dan epitop 54 memiliki afinitas ikatan yang paling besar dengan reseptor EphA3. Pada simulasi dinamika molekuler menggunakan GROMACS, kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 relatif stabil pada 1,72-12,34 ns, dan kompleks epitop 54-reseptor EphA3 stabil dari awal simulasi hingga 15,29 ns.

Kata kunci: *homology modeling*, IDH1 (R132H), vaksin, glioma

ABSTRACT

HOMOLOGY MODELING, DOCKING STUDIES, AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE TYPE 1 (R132H) EPITOPES AS GLIOMA VACCINE CANDIDATES

By

Yeni

NIM: 20714032

(Master Program of Pharmacy)

Glioma is a type of primary malignant brain tumor. The presence of gliomas can be characterized by a mutation R132H of isocitrate dehydrogenase type 1 (IDH1). IDH1 (R132H) contains specific immunogenic epitopes to the tumor. It is appropriate to be used as a gliomas vaccine. Therefore, it was necessary to do homology modeling, docking study and molecular dynamics simulation for IDH1 (R132H) epitopes. TMHMM, MEMSAT-SVM and MEMSAT3 were used to predict transmembrane topology of IDH1 (R132H). Analysis of IDH1 (R132H) epitopes was performed using NetMHCII and IEDB[®]. The antigenicity of epitopes were predicted using VaxiJen to obtained 91 epitopes. Homology modeling using Modeller, I-TASSER and (PS)² was established for the epitopes that have probability as tumor antigen. The results of homology modeling of IDH1 (R132H) epitopes were validated by MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. A 3D stucture model of the epitopes was selected from three models from the homology modeling based on the validation results. Refinement was established on the epitopes using GalaxyRefine and GROMACS for energy minimization. The epitopes were docked to MHC II HLA DRB1 0101 to determine their preventive function and to EphA3 to determine their curative function. It was performed by using Dock. Epitope 42 have the greatest binding affinity to MHC II HLA DRB1 0101, while epitope 54 have the greatest binding affinity to EphA3 receptor. Molecular dynamics simulation using GROMACS showed that the complex of epitope 42-MHC II HLA DRB1 0101 was relatively stable at 1.72 to 12.34 ns, while the complex of epitope 54-EphA3 receptor was stable from the beginning of the simulation to 15.29 ns.

Keywords: homology modeling, IDH1 (R132H), vaccine, glioma

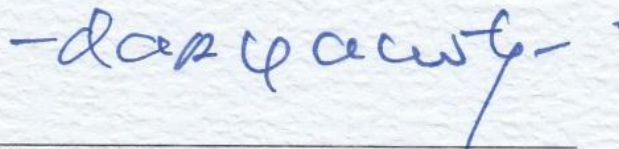
***HOMOLOGY MODELING, STUDI DOCKING, DAN SIMULASI
DINAMIKA MOLEKULER EPITOP ISOCITRATE
DEHYDROGENASE TIPE 1 (R132H) SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN GLIOMA***

Oleh
Yeni
NIM: 20714032
(Program Studi Magister Farmasi)

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui
Pembimbing

Tanggal 05 Oktober 2016



(Prof.Dr. Daryono Hadi Tjahjono, MSc., Apt.)

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis S2 yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Institut Teknologi Bandung, dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang dengan mengikuti aturan HaKI yang berlaku di Institut Teknologi Bandung. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kaidah ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Sitasi hasil penelitian Tesis ini dapat ditulis dalam bahasa Indonesia sebagai berikut:

Yeni. (2016): *Homology Modeling, Studi Docking, dan Simulasi Dinamika Molekuler Epitop Isocitrate Dehydrogenase Tipe 1 (R132H) sebagai Kandidat Vaksin Glioma*, Tesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung.

dan dalam bahasa Inggris sebagai berikut:

Yeni. (2016): *Homology Modeling, Docking Studies, and Molecular Dynamics Simulation of Isocitrate Dehydrogenase Type 1 (R132H) Epitopes as Glioma Vaccine Candidates*, Master's Program Thesis, Institut Teknologi Bandung.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh tesis haruslah seizin Dekan Sekolah Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung.

*Dipersembahkan kepada yang tercinta dan tersayang Ibunda Hj. Maryani,
Ayahanda H. Idris, kakak-kakakku Leti Elita, Am.Keb., dan Nurlena, S.Pd., serta
adik-adikku Yesi, S.Pd., Jihan Idriyani, Rahayu Adha, dan Fadila.*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga buku tesis yang berjudul “*Homology Modeling, Studi Docking, dan Simulasi Dinamika Molekuler Epitop Isocitrate Dehydrogenase Tipe 1 (R132H) sebagai Kandidat Vaksin Glioma*” ini dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelas Master Sains dari Program Studi Magister Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung.

Penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu penelitian ini hingga buku tesis ini selesai dibuat, terutama kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Daryono Hadi Tjahjono, M.Sc., Apt. selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran, dan nasehatnya selama penelitian berlangsung dan selama penulisan tesis ini.
2. Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA atas bantuan beasiswa pendidikan pascasarjana yang diterima selama pendidikan program magister ini.
3. Teman-teman mahasiswa di KK Farmakokimia yang turut memberikan saran selama pengerjaan tesis.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, masukan berupa kritik dan saran sangat diharapkan demi menyempurnakan kekurangan yang ada. Semoga tulisan ini bermanfaat dengan segala keterbatasannya.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	ix
DAFTAR TABEL	x
 BAB I Pendahuluan	 1
 BAB II Tinjauan Pustaka	 4
II.1 Glioma	4
II.2 IDH1 (R132H)	6
II.3 Vaksin Kanker	8
II.4 MHC II	9
II.5 EphA3	10
II.6 <i>Homology Modeling</i>	11
II.7 Studi <i>Docking</i>	13
II.8 Dinamika Molekuler	14
 BAB III Metodologi Penelitian	 16
III.1 Alat dan Bahan	16
III.1.1 Perangkat Keras	16
III.1.2 Perangkat Lunak	16
III.1.3 Bahan	16
III.2 Metode Penelitian	17
III.2.1 Prediksi Topologi Transmembran	17
III.2.2 Analisis Epitop	17
III.2.3 Prediksi Antigenisitas	17
III.2.4 <i>Homology modeling</i>	18
III.2.5 Validasi Model	19
III.2.6 <i>Refinement</i>	19
III.2.7 Studi <i>Docking</i>	19
III.2.8 Simulasi Dinamika Molekuler	20

BAB IV	Hasil dan Pembahasan	21
IV.1	Pengumpulan Data	21
IV.2	Prediksi Topologi Transmembran.....	22
IV.3	Analisis Epitop	23
IV.4	Prediksi Antigenisitas	23
IV.5	<i>Homology modeling</i>	25
IV.6	Validasi Model	31
IV.7	<i>Refinement</i>	37
IV.8	Studi <i>Docking</i>	39
IV.9	Simulasi Dinamika Molekuler	57
BAB V	Penutup	61
V.1	Simpulan	61
V.2	Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA		62

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar II.1	Empat tipe sel glial pada sistem saraf pusat.....	4
Gambar II.2	Peran IDH1 dan IDH2 dalam resistensi apoptosis, stres oksidatif dan pengobatan antikanker.....	7
Gambar II.3	Frekuensi mutasi IDH1 dan IDH2	7
Gambar II.4	Mutasi IDH1 menghasilkan fungsi enzim yang berbeda	8
Gambar IV.1	Hasil prediksi topologi transmembran protein IDH1 (R132H)	22
Gambar IV.2	Hasil <i>multiple alignment</i> epitop 1 dengan template 2CMJ:A dan 5DE1:A	27
Gambar IV.3	Hasil <i>homology modeling</i> 91 epitop dengan Modeller, I-TASSER, dan (PS) ²	29
Gambar IV.4	Plot Ramachandran epitop 1 hasil <i>homology modeling</i> Modeller	35
Gambar IV.5	Plot Z-score struktur epitop 1 hasil <i>homology modeling</i> Modeller pada ProSA-web.....	36
Gambar IV.6	Visualisasi struktur 3D <i>initial</i> dan model 5 hasil <i>refinement</i> GalaxyRefine.....	38
Gambar IV.7	Grafik minimisasi energi struktur 3D epitop 1 dengan GROMACS	38
Gambar IV.8	Perbandingan struktur 3D dari epitop 1 dengan IDH1 (R132H)	39
Gambar IV.9	Perbandingan sebelum dan sesudah <i>redocking</i> reseptor dengan ligan alaminya	40
Gambar IV.10	Visualisasi hasil docking.....	57
Gambar IV.11	Grafik perubahan RMSD terhadap waktu selama simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101.....	58
Gambar IV.12	Perubahan konformasi kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 selama simulasi dinamika molekuler	58
Gambar IV.13	Grafik perubahan RMSD terhadap waktu selama simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 54-reseptor EphA3.....	59
Gambar IV.14	Perubahan konformasi kompleks epitop 54-reseptor EphA3 selama simulasi dinamika molekuler	59
Gambar IV.15	Grafik RMSF simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 dan kompleks epitop 54-reseptor EphA3 selama 25 ns.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Daftar lokus MHC II manusia, alel dan polimorfisme	10
Tabel IV.1	Hasil prediksi antigenisitas epitop dengan 15 asam amino	23
Tabel IV.2	Hasil prediksi antigenisitas epitop dengan 20 asam amino	24
Tabel IV.3	Kode PDB <i>template</i> epitop hasil BLASTP®	26
Tabel IV.4	Hasil validasi model 3D epitop.....	32
Tabel IV.5	Informasi struktur hasil <i>refinement</i> epitop 1 dengan GalaxyRefine	37
Tabel IV.6	Hasil <i>docking</i> epitop dengan MHC II HLA DRB1 0101.....	41
Tabel IV.7	Hasil <i>docking</i> epitop dengan reseptor EphA3.....	48

BAB I Pendahuluan

Tumor otak meliputi sekitar 85-90% dari seluruh tumor susunan saraf pusat. Insidensi berkisar antara 6,6 per 100.000 penduduk per tahun di AS dengan angka mortalitas 4,7 per 100.000 penduduk per tahun. Mortalitas lebih tinggi pada pria (KPKN, 2015).

Berdasarkan data dari GLOBOCAN 2012, Indonesia merupakan negara dengan insidensi tumor otak tertinggi di Asia Tenggara, yaitu 4.903 insidensi dengan angka kematian sebesar 3.402. Tumor otak yang sering terjadi adalah tumor sel glial yang disebut glioma (KPKN, 2015).

Glioma merupakan istilah untuk berbagai jenis tumor otak ganas primer. Usaha besar telah dilakukan untuk menentukan dasar genetik tumor ini, dengan harapan pengetahuan yang didapatkan dapat bermanfaat untuk pengembangan terapi dengan target yang lebih tinggi sehingga dapat merubah prognosis yang umumnya masih lemah (Dimitrov dkk, 2015).

Pada masing-masing entitas tumor, kombinasi dari beberapa parameter berkontribusi dalam menentukan keseluruhan prognosis. Salah satu komponen kombinasi kriteria yang biasa digunakan untuk memprediksi respon dan hasil terapi adalah *grade* dari WHO. Kriteria lainnya meliputi temuan klinik, fitur radiologi, luas reseksi operasi, indeks proliferasi, dan perubahan genetik. Pasien dengan tumor *grade* II dapat bertahan hingga lebih dari 5 tahun dan pasien dengan *grade* III dapat bertahan antara 2-3 tahun. Prognosis pasien dengan tumor *grade* IV bergantung pada efektifitas regimen terapi. Namun, mayoritas pasien glioblastoma terutama geriatri hanya mampu bertahan dalam jangka waktu setahun (Louis dkk, 2007).

Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) (R132H) dapat dijadikan penanda adanya glioma (Labussiere dkk, 2010). IDH1 merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme tubuh untuk menghasilkan Adenosin trifosfat (ATP) pada siklus

asam sitrat. Mutasi pada IDH1 dapat menghasilkan *2-hydroxyglutarat* yang merupakan onkometabolit (Labussiere dkk, 2010; Yang dkk, 2010; Turcan, 2012; Schumacher dkk, 2014). Mutasi somatik pada kodon 132 gen IDH1 yang terletak pada kromosom lokus 2q33 terjadi pada sebagian kecil glioblastoma, tetapi beberapa penelitian melaporkan bahwa mutasi ini terjadi pada sejumlah besar glioma *grade* rendah (Balss dkk, 2008; Bleeker dkk, 2010; Labussiere dkk, 2010; Arita dkk, 2015). Saat ini telah ditemukan 6 mutasi IDH1 yang berbeda dengan frekuensi terbesar pada mutasi R132H dimana terjadi pergantian arginin menjadi histidin, yaitu 89,7% (Arita dkk, 2015).

Dari perspektif imunologi, IDH1 (R132H) merupakan target potensial untuk imunoterapi karena memiliki potensi sebagai neoantigen yang spesifik terhadap tumor. IDH1 (R132H) mengandung epitop imunogenik yang cocok untuk vaksinasi. Epitop IDH1 (R132H) dipresentasikan pada *major histocompatibility complexes* (MHC) kelas II dan menginduksi CD4⁺ T helper-1 (T_H1) yang spesifik terhadap mutasi. Sel CD4⁺ T helper-1 (T_H1) dan antibodi secara spontan terjadi pada pasien glioma dengan mutasi IDH1 (R132H) yang mengenali secara spesifik IDH1 (R132H) (Schumacher dkk, 2014). Bentuk dari IDH1 (R132H) ada pada semua permukaan sel tumor dan sangat spesifik pada tumor tersebut. Oleh karena itu, untuk memberikan sinyal pada sistem imun pasien terhadap IDH1 (R132H) dan tanpa merusak sel sehat maka dapat digunakan vaksin.

Vaksin kanker memiliki potensi sebagai modalitas yang efektif untuk pengobatan atau bahkan pencegahan malignan (Clifton dkk, 2015). Saat ini kebanyakan vaksin dalam uji klinik bergantung pada lisat sel tumor atau isolasi keseluruhan protein yang dapat menjadi immunosupresan. Terapi dengan menggunakan vaksin untuk kanker telah menunjukkan respon imun pada beberapa jenis tumor. Namun, kurangnya respon imun yang dikendalikan dapat membatasi efikasi vaksin kanker. Epitop vaksin yang didesain secara rasional dapat menghasilkan respon imun yang terkendali. Dengan adanya perkembangan pustaka data struktural peptida dan pengetahuan yang lebih tentang proses presentasi MHC dan antigen, desain

rasional vaksin peptida dapat meningkatkan efektifitas imunoterapi kanker (Cherryholmes dkk, 2015).

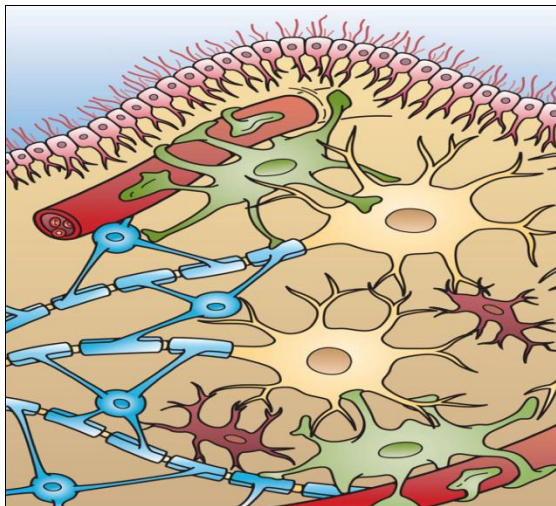
Peptida antigenik berasal dari protein yang diekspresikan oleh sel-sel tumor target. Oleh karena itu, prediksi apakah peptida akan mengikat molekul MHC tertentu pada manusia penting untuk pengembangan vaksin berbasis peptida dan saat ini pendekatan komputasi telah diciptakan untuk mengidentifikasi peptida tersebut (Schiewe dan Haworth, 2007). Desain vaksin yang rasional didapatkan dari perkembangan *database* vaksin dan perangkat *in silico* (He dan Xiang, 2013). Dengan penggunaan metode berbasis *in silico* dalam memprediksi epitop untuk memproduksi vaksin peptida yang telah didesain secara rasional dapat meningkatkan efikasi vaksin tersebut (Cherryholmes dkk, 2015).

Berdasarkan hal-hal tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah merancang model 3D dari epitop-epitop IDH1 (R132H), mengetahui potensi preventif dan kuratif epitop-epitop tersebut sebagai vaksin glioma, serta memprediksi kestabilan reseptor-epitop dengan menggunakan simulasi dinamika molekuler. Untuk mencapai tujuan tersebut, digunakan beberapa perangkat pemodelan dan validasi untuk membuat model yang baik serta perangkat studi *docking* dan simulasi dinamika molekuler untuk mengetahui afinitas epitop terhadap MHC II dan reseptor glioma.

BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Glioma

Glioma adalah suatu tumor otak yang berasal dari sel glial (McPherson, 2016). Sel glial merupakan jenis sel yang paling melimpah di dalam sistem saraf pusat manusia (SSP) dengan fungsi penting dalam perkembangan saraf, plastisitas, transduksi sinyal, sel *microenvironment*, dan imunitas (Sampson, 2016). Terdapat beberapa tipe sel glial dengan fungsi yang berbeda, yaitu astrosit yang berperan dalam transpor nutrisi dan pertahankan lingkungan kerja neuron, oligodendrosit yang menyediakan insulasi (myelin) pada neuron, mikroglial yang membersihkan neuron yang telah mati dan patogen, serta sel endipimal yang mensekresikan cairan serebrospinal (Gambar II.1) (McPherson, 2016).



Gambar II.1 Empat tipe sel glial pada sistem saraf pusat: astrosit (hijau), oligodendrosit (biru), mikroglial (merah) dan sel endipimal (merah muda) (Fischer / CC BY 3.0 via Commons).

World Health Organization (WHO) membagi glioma menjadi 4 *grade* berdasarkan histopatologi dan kriteria kliniknya (Sampson, 2016). Pada *grade I*, jaringan masih berupa benign, sel terlihat masih menyerupai sel otak normal dan pertumbuhannya lambat. Pada *grade II*, jaringan sudah menjadi malignant, sel terlihat sedikit berubah dari sel normal dan pertumbuhannya pun lambat. Pada *grade III*, sel jaringan malignant terlihat sangat berbeda dengan sel normal dan tumbuh aktif (anaplastik). Sementara itu, pada *grade IV*, jaringan malignant

memiliki sel yang sangat tidak normal dan terus tumbuh dengan cepat (Anonim, 2009). Glioma *grade* I-II disebut glioma derajat rendah (astrocitoma *grade* I/II, oligodendroglioma) dan *grade* III-IV disebut glioma derajat tinggi (astrocitoma anaplastik *grade* III, glioblastoma *grade* IV, anaplastik oligodendroglioma) (KNPK, 2015; Sampson, 2016).

Jenis dan *grade* glioma menentukan perjalanan klinis pasien, termasuk rencana pengobatan dan prognosis. Namun, diagnosis histopatologi glioma yang akurat sulit dilakukan karena heterogenitas tumor yang besar, tumpang tindih fitur oligodendroglioma dan astrositik pada beberapa tumor, serta ambiguitas kriteria untuk subtype tertentu. Penelitian terbaru telah menjelaskan perubahan genetik yang berbeda pada setiap jenis glioma yang dapat dijadikan penanda molekular yang spesifik terhadap tumor. Hal ini tidak hanya memberikan pengetahuan mengenai mekanisme biologis kanker, tetapi juga menyediakan penanda genetik yang lebih objektif untuk diagnosis subtype glioma sehingga memungkinkan stratifikasi prognostik yang lebih akurat pada pasien (Sampson, 2016).

Pada dasarnya kanker adalah penyakit genetik yang disebabkan oleh akumulasi perubahan genetik. Hal tersebut memungkinkan deregulasi pertumbuhan sel dan proliferasi sehingga terbentuk tumor. Penelitian komposisi genetik glioma telah mengungkapkan frekuensi mutasi dan perubahan jumlah salinan yang berbeda untuk masing-masing subtype glioma. Perubahan ini termasuk mutasi pada promotor *telomerase reverse transcriptase* (TERT) yang terdapat pada lebih dari 80% glioblastoma primer dan oligodendroglioma, serta mutasi pada enzim metabolik *isocitrate dehydrogenase* 1 dan 2 (IDH1, IDH2) yang terdapat pada lebih dari 70% astrocytomas *grade* II-III, oligodendroglioma, dan glioblastoma sekunder (Turcan dkk, 2012; Sampson, 2016).

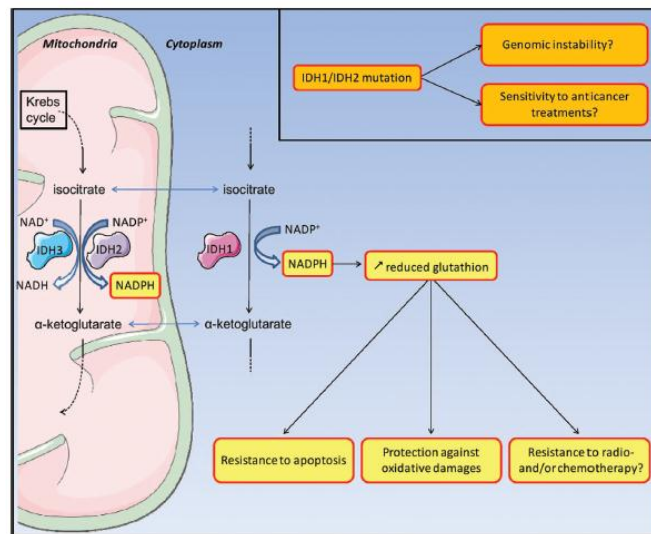
Gejala yang timbul pada pasien dengan tumor otak tergantung dari lokasi dan tingkat pertumbuhan tumor. Kombinasi gejala yang sering ditemukan adalah peningkatan tekanan intrakranial (sakit kepala hebat disertai muntah proyektil), defisit neurologis yang progresif, kejang dan penurunan fungsi kognitif. Pada

glioma derajat rendah gejala yang biasa ditemui adalah kejang, sementara glioma derajat tinggi lebih sering menimbulkan gejala defisit neurologis progresif dan tekanan intrakranial meningkat (KNPK, 2015).

Beberapa penelitian telah mengungkapkan onkogenesis dari glioma. Faktor endogen yang dapat menyebabkan glioma, yaitu fakomatosis, penyakit Recklinghausen, dan perubahan genetik yang telah dijelaskan sebelumnya. Selain itu, terdapat pula faktor eksogen penyebab glioma, yaitu trauma pada kepala, radioterapi, dan virus. Glioma sebagai penyakit hereditas masih menjadi suatu hipotesis (Suzuki, 1988). Pengobatan glioma saat ini dapat dilakukan dengan operasi, terapi radiasi, dan kemoterapi (Anonim, 2009).

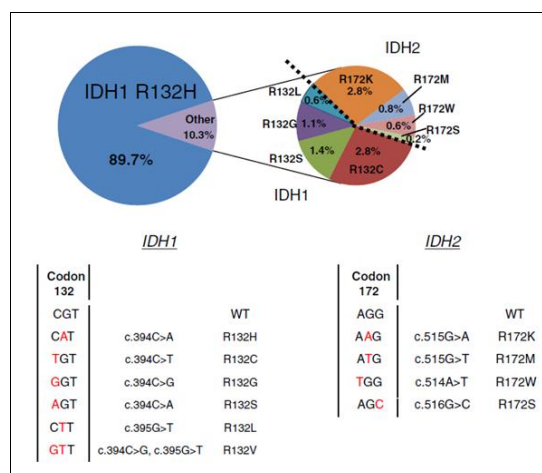
II.2 IDH1 (R132H)

Isocitrate dehydrogenase tipe 1 (R132H) merupakan hasil dari mutasi gen *Isocitrate dehydrogenase* tipe 1 kodon 132 yang terletak pada lokus kromosom 2q33 yang menyebabkan Arginin (R) digantikan oleh Histidin (H) (Labussiere dkk, 2010). *Isocitrate dehydrogenase* (IDH) merupakan enzim katalis pada tahap ketiga siklus asam sitrat (siklus Krebs) yang mengubah *isocitrate* (ICT) menjadi α -ketoglutarat (α KG) dengan NADP^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) atau NAD^+ sebagai kofaktor. Sel manusia mengekspresikan 3 jenis enzim IDH yang berbeda, yaitu IDH1 sitosolik *NADP⁺-dependent*, IDH2 mitokondrial *NADP⁺-dependent* dan IDH3 mitokondrial *NAD⁺-dependent* (Gambar II.2) (Yang dkk, 2010). IDH1 dan IDH2 mengkatalis proses karboksilasi oksidatif ICT menjadi α KG dengan adanya reduksi NADPH. Produksi NADPH penting untuk regenerasi *reduced glutathione* yang berfungsi sebagai antioksidan pada sel dan meningkatkan resistensi terhadap apoptosis (Gambar II.2) (Labussiere dkk, 2010).

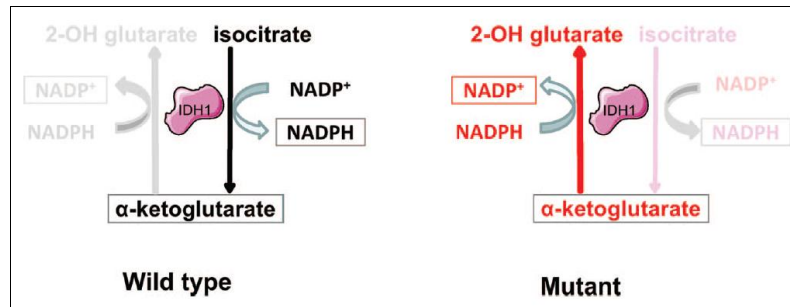


Gambar II.2 Peran IDH1 dan IDH2 dalam resistensi apoptosis, stres oksidatif dan pengobatan antikanker (Labussiere dkk, 2010).

Mutasi IDH1 dan IDH2 terjadi pada lebih dari 70% glioma grade II-III dan pada beberapa glioblastoma (Turcan dkk, 2012). Mutasi IDH1 dan IDH2 juga terjadi pada kanker lain, seperti leukemia myeloid akut, leukemia limfoblastik, kanker kolorektal dan kanker prostat, tetapi dengan frekuensi rendah (Yang dkk, 2010). Mutasi IDH1 (R132H) merupakan mutasi yang sangat sering terjadi pada glioma dengan frekuensi 89,7% (Gambar II.3) (Arita dkk, 2015). Mutasi pada IDH1 dapat menghasilkan *2-hydroxyglutarat* (2-HG) yang memiliki potensi sebagai onkometabolit (Gambar II.4) (Labussiere dkk, 2010; Yang dkk, 2010; Turcan dkk, 2012; Schumacher dkk, 2014).



Gambar II.3 Frekuensi mutasi IDH1 dan IDH2. Rasio dihitung dari sejumlah data 8 penelitian independent, termasuk data dari 3.029 kasus glioma (Arita dkk, 2015).



Gambar II.4 Mutasi IDH1 menghasilkan fungsi enzim yang berbeda (Labussiere dkk, 2010).

IDH1 (R132H) merupakan antigen tumor imunogenik yang epitop-epitopnya dipresentasikan pada *major histocompatibility complexes* (MHC) kelas II sehingga dapat menginduksi CD4⁺ T helper-1 (T_H1) yang spesifik terhadap mutasi. Selain itu, IDH1 (R132H) juga menginduksi respon antibodi yang dapat mengontrol pertumbuhan tumor yang mengekspresikan IDH1 (R132H) (Schumacher dkk, 2014).

II.3 Vaksin Kanker

Vaksin kanker merupakan sediaan farmasi yang termasuk dalam senyawa *biological response modifiers* yang bekerja untuk menstimulasi respon imun sehingga mampu mencegah terjadinya penyakit kanker (Lollini dkk, 2006). Respon imun tersebut dapat terjadi pada subset tumor yang mengekspresikan antigen imunogenik. Antigen tumor diklasifikasikan ke dalam 2 kategori, yaitu *tumor-specific antigen* (TSA) dan *tumor-associated antigen* (TAA). TSA merupakan antigen sasaran ideal untuk terapi imun tumor. Respon imun terhadap antigen demikian memberikan harapan besar untuk dapat menghancurkan sel tumor tanpa merusak sel sehat. Contoh TSA adalah protein yang diproduksi akibat mutasi satu atau lebih gen. Jenis TSA lain adalah protein dalam tumor yang diinduksi oleh virus. Sedangkan TAA dapat timbul oleh mutasi sel tumor yang memproduksi protein yang berubah (Kaufman dan Wolchok, 2007; Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Sel-sel kanker yang mengekspresikan TAA dan berasosiasi dengan molekul MHC dapat dikenali dan didestruksi oleh sel T yang spesifik terhadap tumor (Palmer dkk, 2001; Kovjazina dkk, 2011).

Terdapat 2 jenis vaksin kanker berdasarkan tujuan penggunaannya, yaitu *cancer prophylactic vaccines*, yang digunakan untuk mencegah terjadinya kanker dan *cancer therapeutic vaccines*, yang digunakan untuk mengobati penyakit kanker dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap kanker (Lollini dkk, 2006). Sementara berdasarkan asalnya, terdapat beberapa jenis vaksin kanker, yaitu vaksin peptida dan protein, vaksin DNA, vaksin virus dan bakteri rekombinan, vaksin sel dendritik, vaksin *whole cell*, dan vaksin karbohidrat (Kaufman dan Wolchok, 2007).

Jenis vaksin yang saat ini mulai banyak dikembangkan adalah vaksin berbasis peptida karena dapat mencegah terjadinya penekatan sistem imun dengan menghindari munculnya respon sel T yang berlebihan (Cherryholmes dkk, 2015). Vaksin peptida merupakan vaksin subunit yang hanya mengandung epitop dari antigen protektif. Bagian lain dari protein yang menimbulkan efek supresif terhadap sistem imun, efek toksik atau bereaksi silang dengan protein endogen sudah dihilangkan. Vaksin peptida pada umumnya menginduksi respon imun yang potensinya bergantung pada MHC (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

II.4 MHC II

Sel T CD4⁺ mengenali epitop peptida yang diikat oleh molekul pada permukaan *antigen presenting cells* (APCs) yang disebut *major histocompatibility complexes* kelas II (MHC II). MHC II adalah suatu heterodimer yang mengandung rantai α dan β polimorfik dengan daerah transmembran. MHC II mengikat antigen yang berasal dari ekstraseluler yang masuk melalui fagositosis atau endositosis dan dibawa ke dalam kompartemen endositik (endosomal/lisosomal). Antigen tersebut akan melewati kompartemen dan mengalami aktivitas proteolitik hingga mencapai endosom akhir dimana terdapat MHC II yang telah disintesis di dalam *endoplasmic reticulum* (ER). Kemudian kompleks MHC II dan antigen dibawa menuju permukaan sel untuk dipresentasikan pada Sel T CD4⁺ (Prendergast dan Jaffe, 2013).

Rantai α dan β molekul MHC II dikodekan oleh salah satu dari tiga lokus, yaitu *human leucocyte antigen* (HLA) DR, DP dan DQ. Hal tersebut menyebabkan HLA kelas II memiliki spesifisitas ikatan peptida yang berbeda. Dari *database* HLA dapat diketahui alel-alel HLA kelas II untuk molekul HLA-DR, HLA-DP dan HLA-DQ (Tabel II.1) (Wang dkk, 2010).

Tabel II.1 Daftar lokus MHC II manusia, alel dan polimorfisme (Wang dkk, 2010)

Lokus	Gen	Rantai	Jumlah Alel
HLA-DP	HLA-DPA1	α	28
HLA-DP	HLA-DPB1	β	138
HLA-DQ	HLA-DQA1	α	35
HLA-DQ	HLA-DQB1	β	108
HLA-DR	HLA-DRA	α	3
HLA-DR	HLA-DRB1	β	785
HLA-DR	HLA-DRB2	β	1
HLA-DR	HLA-DRB3	β	52
HLA-DR	HLA-DRB4	β	14
HLA-DR	HLA-DRB5	β	19
HLA-DR	HLA-DRB6	β	3
HLA-DR	HLA-DRB7	β	2
HLA-DR	HLA-DRB8	β	1
HLA-DR	HLA-DRB9	β	1

MHC II diekspresikan oleh sel B, makrofag, APC, sel epitel timus dan sel T yang teraktivasi. MHC II dapat mengakomodasi 10-30 residu peptida (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Ikatan peptida terhadap MHC II umumnya ditentukan oleh inti fragmen peptida yang terdiri dari 9 asam amino, tetapi asam amino lain yang mengapit inti (*peptide flanking region*, PFR) juga berpengaruh terhadap kekuatan ikatan peptida (Andreatta dkk, 2011).

II.5 EphA3

Reseptor Eph (*Erythropoietin producing hepatocellular*) merupakan famili terbesar dari reseptor tirosin kinase (RTK) dan memiliki fungsi yang vital, yaitu mengontrol penyebaran sel, adhesi sel, migrasi sel, proliferasi sel, pemanduan axon selama masa perkembangan sel dan homeostasis, serta berperan dalam *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) (Day dkk, 2013; Vail dkk, 2014). Eph dapat memiliki fungsi yang berlawanan apabila tidak ada aktivitas kinase

(Vail dkk, 2014). Reseptor Eph yang berinteraksi dengan ligan pada membran sel disebut ephrin. Berdasarkan kesamaan sekuens dan spesifisitas dalam mengikat ligan, ephrin dibagi menjadi 2 kategori, yaitu Ephrin-A dan Ephrin-B. Ephrin-A berikatan dengan *glycosyl phosphatidyl inositol* (GPI), sedangkan Ephrin-B melekat dengan transmembran. Pada mamalia terdapat 9 EphA dan 5 EphB. Eph dan ephrin biasanya diekspresikan berlebihan pada kanker (Janes dkk, 2014; Vail dkk, 2014).

Penelitian saat ini mengidentifikasi bahwa reseptor EphA3 diekspresikan dalam jumlah besar pada proporsi yang signifikan dari glioma dan subtipe mesenkim dari glioblastoma. EphA3 diekspresikan dalam jumlah yang lebih besar pada awal pembentukan tumor dimana belum terjadinya diferensiasi sel. EphA3 berperan aktif menjaga sel-sel tumor tersebut dalam keadaan tidak berdiferensiasi. Oleh karena itu, reseptor EphA3 dapat dijadikan target terapi pada tumor ini (Day dkk, 2013).

II.6 Homology Modeling

Homology modeling dilakukan untuk memprediksi struktur tiga dimensi (3D) dari protein yang diharapkan sebanding dengan hasil eksperimen dengan adanya data sekuens protein tersebut. *Homology modeling* merupakan solusi untuk mendapatkan informasi struktur protein apabila terjadi kegagalan dalam eksperimen karena protein yang terlalu besar untuk analisis NMR dan tidak dapat dikristalisasi untuk difraksi sinar X (Krieger dkk, 2003). Informasi mengenai struktur protein dapat digunakan untuk menentukan fungsi protein. Proses *homology modeling* struktur protein dilakukan menggunakan protein homolog atau protein yang memiliki hubungan struktur dalam famili yang sama dengan asumsi bahwa protein dalam satu famili dihubungkan oleh evolusi *ancestor* yang memberikan bentuk dasar yang sama. *Homology modeling* dapat dikombinasi dengan metode komputasi lainnya, seperti *docking* untuk mengetahui potensi interaksi dengan substrat, inhibitor atau kofaktor (Pitman dan Menz, 2006).

Terdapat 5 tahap utama dalam *homology modeling*, meliputi:

1. Identifikasi struktur protein untuk dijadikan sebagai *template*. Suatu protein dapat dijadikan *template* apabila memiliki keidentikan minimal 30% dengan protein target. Semakin besar keidentikan sekuens, maka model protein target semakin akurat. Akurasi model dapat ditingkatkan dengan menggunakan lebih dari satu *template*.
2. *Alignment* sekuens protein target dengan sekuens *template*. Tahap ini sangat penting dalam proses *modeling* karena menentukan akurasi dari model akhir. Apabila keidentikan sekuens kurang dari 30%, *alignment* dapat dilakukan dengan sekuens protein dari famili yang berbeda dengan *alignment* yang tepat.
3. Pembentukan model dengan panduan hasil *alignment*, dimana sekuens target ditempatkan pada koordinat 3D struktur *template*. Secara garis besar, terdapat 3 pendekatan dalam *homology modeling*, yaitu metode *fragment based*, *segment matching* dan *satisfaction of spatial restraints*. Pada metode *fragment based*, *alignment* sekuens target dan *template* dilakukan dengan mengidentifikasi *structurally conserved regions* (SCR) yang cenderung berupa α -helix atau β -sheet. SCR dengan similaritas yang rendah (*variable region*, VR) umumnya membentuk struktur *loop*. Metode *segment matching* didasarkan pada observasi segmen heksa-peptida struktur protein yang dapat dikelasterisasi ke dalam 100 kelas. Sementara itu, metode *satisfaction of spatial restraints* mengidentifikasi model secara keseluruhan dari potongan daerah yang spesifik.
4. *Refinement* model untuk optimasi struktur, stereokimia dan energi. *Refinement* model dapat dilakukan dengan minimisasi energi dan dinamika molekuler. Metode minimisasi energi memiliki radius konvergensi yang kecil dimana atom hanya bergerak di dalam area kecil untuk menemukan energi lokal minimal. Minimisasi energi ini dapat menghilangkan benturan sterik rantai samping dan mempertahankan geometri kovalen yang realistis di sekitar atom. Dinamika molekuler memungkinkan deviasi yang lebih besar untuk menemukan energi global minimal. Dinamika molekuler digunakan

untuk optimasi struktur dengan mengatasi hambatan energi yang memisahkan energi lokal minimal.

5. Validasi atau evaluasi model dengan mempertimbangkan letak residu, interaksi dengan residu lain dan atom-atom yang menyusun residu tersebut. Evaluasi model dapat berupa evaluasi sifat stereokimia dan evaluasi sifat spasial protein (Pitman dan Menz, 2006).

II.7 Studi Docking

Docking merupakan istilah yang digunakan dalam skema komputasi untuk menemukan interaksi antara dua molekul (reseptor dan ligan). Dari *docking* didapatkan koordinat atom-atom kedua molekul yang memprediksi asosiasi ikatan keduanya (Halperin dkk, 2002). Tujuan dari *software docking* adalah untuk memahami dan memprediksi pengenalan molekuler dengan cara mencari sisi ikatan antara dua molekul dan memprediksi afinitas ikatannya. *Docking* dapat dilakukan antara ligan dengan protein ataupun protein dengan protein (Morris dan Lim-Wilby, 2008; Meng dkk, 2011).

Mengetahui letak sisi ikatan sebelum proses *docking* dapat meningkatkan efisiensi *docking*. Pada banyak kasus, sisi ikatan pada reseptor telah diketahui sebelum dilakukan *docking* dengan ligan. Informasi tentang sisi ikatan tersebut didapatkan dari hasil perbandingan protein target dengan protein dalam satu famili yang memiliki fungsi serupa atau protein hasil kokristalisasi dengan ligan lain (Meng dkk, 2011).

Terdapat 3 metode *docking*, yaitu *rigid body docking*, *flexible ligand docking* dan *flexible docking*. Pada *rigid body docking*, reseptor dan ligan berada dalam keadaan *rigid*. Pada *flexible ligand docking*, reseptor tetap dalam keadaan *rigid*, tetapi ligan dalam keadaan fleksibel. Sementara itu, pada *flexible docking* atau dapat pula disebut *soft docking*, reseptor dan ligan berada dalam keadaan fleksibel (Mohan dkk, 2005; Meng dkk, 2011).

Semua metode *docking* memerlukan fungsi skoring untuk menentukan tingkat dari berbagai kandidat sisi ikatan dan metode pencarian untuk mengeksplorasi daerah variabel. Dengan adanya fungsi skoring maka dapat digambarkan pose molekul yang benar. Fungsi skoring mengestimasi afinitas ikatan antara protein dan ligan dengan mengadopsi berbagai asumsi dan penyederhanaan. Fungsi skoring diklasifikasikan dalam 3 kategori, yaitu *knowledge-based*, *empirical* dan *forcefield-based* (Mohan dkk, 2005; Morris dan Lim-Wilby, 2008; Meng dkk, 2011).

Metode pencarian dibagi menjadi 2 kategori utama, yaitu sistematis dan stokastik. Pada metode sistematis dilakukan pengambilan sampel daerah pencarian dengan interval yang telah ditetapkan dan hasilnya berupa deterministik. Metode stokastik membuat perubahan acak secara berulang pada daerah variabel hingga kriteria terminasi yang ditetapkan terpenuhi. Oleh karena itu, hasil metode stokastik bervariasi. Metode sistematis umumnya digunakan dalam *rigid body docking* protein-protein. Metode stokastik lebih cocok digunakan untuk masalah dimensional yang lebih besar, seperti *flexible docking* ligan-protein (Morris dan Lim-Wilby, 2008). Metode-metode *docking* secara ekstensif menggunakan algoritma pencarian Monte Carlo, algoritma genetika, *fragment-based* dan dinamika molekuler (Mohan dkk, 2005).

II.8 Dinamika Molekuler

Salah satu alat utama dalam studi teoritis molekul biologis adalah metode simulasi dinamika molekuler. Metode komputasi ini mengkalkulasi pergerakan sistem molekuler terhadap waktu. Simulasi dinamika molekuler telah memberikan informasi tentang fluktuasi dan perubahan konformasi protein dan asam nukleat. Metode ini sekarang secara rutin digunakan untuk menyelidiki struktur, dinamika dan termodinamika molekul biologis dan kompleksnya.

Teknik simulasi dinamika molekuler saat ini telah meluas, misalnya saja pada penggabungan mekanika kuantum dengan simulasi klasik yang digunakan untuk mempelajari reaksi enzimatik dalam protein lengkap. Teknik simulasi dinamika

molekuler juga banyak digunakan dalam prosedur eksperimental seperti kristalografi sinar X dan determinasi struktur NMR.

Metode simulasi dinamika molekuler didasarkan pada hukum Newton II atau persamaan gerak, $F=ma$, dimana F adalah gaya yang bekerja pada partikel, m adalah massa dan a adalah percepatannya. Pengetahuan tentang gaya pada setiap atom memungkinkan untuk menentukan percepatan setiap atom dalam sistem. Integrasi persamaan gerak kemudian menghasilkan lintasan yang menggambarkan posisi, kecepatan dan percepatan partikel yang bervariasi terhadap waktu. Dari lintasan ini, nilai rata-rata sifat atom dapat ditentukan. Metode ini bersifat deterministik karena dengan mengetahui posisi dan kecepatan dari setiap atom, maka keadaan sistem dapat diprediksi terhadap waktu.

Grafik *root mean square deviation* (RMSD) muncul di setiap publikasi yang berhubungan dengan simulasi dinamika molekuler. Umumnya grafik ini menyajikan kemiringan tajam selama beberapa *nanosecond* (ns) pertama dan berosilasi di sekitar nilai rata-rata yang konstan selama sisa simulasi. Analisis lainnya adalah grafik *root mean square fluctuations* (RMSF). RMSF didefinisikan sebagai standar deviasi dari nilai-nilai RMSD seluruh lintasan. RMSF mengukur besarnya fluktuasi setiap atom atau residu pada protein (Pineiro, 2009).

BAB III Metodologi Penelitian

III.1 Alat dan Bahan

III.1.1 Perangkat Keras

ASUS X450J CPU Intel Core i7-4720HQ 3.6 GHz 64-bit 4GB.

III.1.2 Perangkat Lunak

NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), Protein Data Bank (<http://rcsb.org/>), TMHMM versi 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), NetMHCII versi 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), IEDB (<http://tools.iedb.org/mhcii/>), VaxiJen versi 2.0 (www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/), Modeller versi 9.15, I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>), (PS)² versi 2.0 (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>), BLASTP[®] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clustal Omega versi 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>), GROMACS versi 5.0.6, GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>), Dock versi 6.7, Chimera versi 1.10.2, Discovery Studio versi 16.1.0.15350, dan VMD versi 1.9.2.

III.1.3 Bahan

Protein uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) *Homo sapiens* yang terdiri dari 414 asam amino dengan penggantian Arginin menjadi Histidin pada urutan asam amino ke-132. Protein IDH1 diunduh dalam format FASTA dari NCBI dengan nomor *accession* CAG38738.1. MHC II HLA DRB1 0101 dengan kode 1AQD dan reseptor EphA3 dengan kode 4TWO diunduh dari Protein Data Bank.

III.2 Metode Penelitian

III.2.1 Prediksi Topologi Transmembran

Topologi transmembran protein IDH1 (R132H) diprediksi dengan menggunakan TMHMM versi 2.0 (Krogh dkk, 2001), MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 (Krogh dkk, 2001; Nugent dan Jones, 2009). Prediksi ini dilakukan untuk mengetahui apakah protein IDH1 (R132H) merupakan protein transmembran dengan adanya transmembran helix pada protein.

III.2.2 Analisis Epitop

Analisis epitop-epitop IDH1 (R132H) dilakukan menggunakan NetMHCII versi 2.2 (Nielsen dkk, 2007; Andreatta dkk, 2011) dan IEDB (Wang dkk, 2008; Wang dkk, 2010). dengan alel HLA-DRB10101. Pada NetMHCII, tiap epitop terdiri dari 15 dan 20 asam amino, sedangkan pada IEDB, tiap epitop terdiri dari 15 asam amino. Epitop-epitop yang dipilih dari hasil NetMHCII adalah epitop yang memiliki ikatan yang kuat dengan MHC II, yaitu epitop yang memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 nM. Epitop-epitop yang dipilih dari hasil IEDB adalah epitop yang memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II. Afinitas ikatan tersebut dapat dilihat dari nilai *percentile rank* (*%Rank*). Semakin kecil *%Rank*-nya maka semakin tinggi afinitas ikatannya. Hasil analisis epitop pada IEDB diurutkan berdasarkan *%Rank* terendah. Epitop yang terdiri dari 15 asam amino akhirnya dipilih dari hasil IEDB dengan *%Rank* rendah hingga batas tidak ditemukan lagi epitop dengan ikatan kuat dari hasil NetMHCII (Nielsen dkk, 2007; Wang dkk, 2008; Wang dkk, 2010; Andreatta dkk, 2011).

III.2.3 Prediksi Antigenisitas

Protein dan epitop-epitop yang memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II diprediksi antigenisitasnya dengan menggunakan VaxiJen (Doytchinova dan Flower, 2007). Pada VaxiJen, protein dan epitop-epitop dimasukkan dalam format fasta dengan target organisme tumor, batas ambang 0,4 dan *auto cross covariance* (ACC) sebagai *output*. Protein dan epitop dengan batas ambang $\geq 0,4$ memiliki kemungkinan sebagai antigen (Fooladi dkk, 2014).

III.2.4 Homology modeling

Homology modeling epitop-epitop yang memiliki kemungkinan sebagai antigen dilakukan dengan menggunakan tiga perangkat lunak, yaitu Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)² versi 2.0 (Chen dkk, 2006; Chen dkk, 2009). Sebelum dilakukan *homology modeling*, terlebih dahulu dilakukan identifikasi *template* dan *alignment* epitop-epitop tersebut dengan protein-protein yang ada dalam *database* PDB dengan menggunakan BLASTP[®]. Dua *template* terbaik dipilih berdasarkan keidentikan sekuens, *query cover* dan *E-value* (Kandasamy dkk, 2014). *Alignment* epitop dengan kedua *template* juga dilakukan dengan menggunakan Clustal Omega versi 1.2.1 yang kemudian akan digunakan untuk *homology modeling* dengan I-TASSER.

Pada Modeller versi 9.15 digunakan jenis *modeling* dasar dengan 2 *template* hasil dari BLASTP[®]. Kedua *template* tersebut kemudian diseleksi kembali dalam Modeller dan dipilih *template* dengan keidentikan serta resolusi kristalografik yang lebih baik. Setelah itu, dilakukan *alignment* dan *modeling* sehingga dihasilkan 5 model 3D epitop. Model yang dipilih adalah model dengan nilai *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) terkecil (Shen dan Sali, 2006) dan nilai GA341 terbesar (Melo dkk, 2002; John dan Sali, 2003).

Pada *server* I-TASSER dimasukkan sekuens epitop dalam format FASTA dan hasil *alignment* dari Clustal Omega sebagai *template* acuan dalam pemodelan epitop. Dari hasil *homology modeling* I-TASSER didapatkan 5 model 3D dari epitop dan dipilih 1 model dengan *C-score* terbesar (Zhang, 2008; Roy dkk, 2010; Yang dkk, 2015). Sementara itu, pada *server* (PS)² versi 2.0 dimasukkan sekuens epitop dalam format FASTA dan *template* terbaik dari hasil BLASTP[®] yang akan dilakukan *alignment* serta *homology modeling*. Dari hasil (PS)² didapatkan 1 model 3D. Model tersebut dapat digunakan apabila memiliki persentase *alignment* 100%.

III.2.5 Validasi Model

Hasil *homology modeling* epitop-epitop dari Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)² versi 2.0 divalidasi dengan MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. Pada MolProbity didapatkan *Clash Score*, *Poor Rotamers*, *Ramachandran Favored* dan *MolProbity Score*. Sementara itu, ProSA-web dan QMEAN berturut-turut menghasilkan *Z-score* dan *QMEAN Score*. *Clash Score* $\geq 0,4$ Å merupakan nilai yang buruk. Model yang baik memiliki *Poor Rotamers* $< 0,3\%$, *Ramachandran Favored* $> 98\%$, *MolProbity Score* < 2 Å (Chen dkk, 2009), *Z-score* yang masuk ke dalam *range Z-score* protein berukuran sama dari PDB (Wiederstein dan Sippl, 2007) dan *QMEAN score* 0-1 (Benkert dkk, 2009; Benkert dkk, 2009; Benkert dkk, 2011). Dari 3 model 3D epitop Modeller, I-TASSER dan (PS)² dipilih 1 model dengan hasil validasi terbaik untuk kemudian dilakukan *refinement* dan studi *docking*.

III.2.6 Refinement

Refinement model epitop yang telah divalidasi dilakukan menggunakan GalaxyRefine dan GROMACS versi 5.0.6. Pada GalaxyRefine epitop diunggah dalam format PDB. GalaxyRefine memberikan perturbasi struktur yang diulang dan relaksasi struktural secara keseluruhan dengan simulasi dinamika molekuler. Kemudian didapatkan 5 model epitop dengan parameter-parameter validasi, yaitu GDT-HA, RMSD, *MolProbity Score*, *Clash Score*, *Poor Rotamers* dan *Ramachandran Favored*. Dari kelima model tersebut dipilih 1 model terbaik dengan GDT-HA $> 60\%$, RMSD ≤ 2 Å, *MolProbity Score* < 2 Å, *Clash Score* $< 0,4$ Å, *Poor Rotamers* $< 0,3\%$ dan *Ramachandran Favored* $> 98\%$ (Ko dkk, 2012; Ko dkk, 2012; Heo dkk, 2013; Lee dkk, 2015). Setelah itu, dilakukan minimisasi energi pada model tersebut dengan menggunakan GROMACS dengan *force field* AMBER99SB-ILDN (Summa dan Levitt, 2006; Lindorff-Larsen dkk, 2010; Apol dkk, 2015).

III.2.7 Studi Docking

Studi *docking* dilakukan dengan menggunakan Dock versi 6.7 (Theresa dkk, 2015). Epitop di-*docking* dengan MHC II HLA DRB1 0101 dan reseptor EphA3

yang telah dipisahkan dengan ligan alaminya menggunakan Discovery Studio. Ligan alami MHC II HLA DRB1 0101 adalah peptida A2 dan ligan alami EphA3 adalah senyawa 164. Metode *docking* yang digunakan adalah *rigid body docking* (Mohan dkk, 2005). Sebelum dilakukan *docking* epitop terhadap reseptor, dilakukan *redocking* terlebih dahulu antara reseptor dengan ligan alaminya sehingga didapatkan $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ (Kiszka, 2011).

Pada proses *docking*, dilakukan preparasi epitop dan reseptor dengan penambahan hidrogen dan muatan serta pembuatan *surface* menggunakan Chimera versi 1.10.2. Kemudian dibuat *spheres* epitop dan reseptor sehingga terbentuk beberapa *cluster*. Pada reseptor dipilih 1 *cluster* yang memiliki jumlah *spheres* paling banyak dengan ligan alaminya. Setelah itu, dibuat box di sekitar sisi aktif reseptor dengan ekstra *margin* 20 $\text{\AA}$ yang akan digunakan untuk pembuatan *grid* untuk kemudian dilakukan *redocking*. Grid hasil *redocking* digunakan pula untuk *docking* epitop terhadap reseptor. Dari hasil *docking* didapatkan *grid score*. Semakin negatif *grid score* maka semakin besar afinitas ikatan epitop dengan reseptor. Hasil docking divisualisasi dengan menggunakan Discovery Studio versi 16.1.0.15350 dan dilihat ikatan hidrogen yang terbentuk. Epitop yang memiliki *grid score* paling negatif dipilih untuk dilakukan simulasi dinamika molekuler.

III.2.8 Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan menggunakan GROMACS versi 5.0.6. pada kompleks epitop-MHC II HLA DRB1 0101 dan epitop-EphA3 yang telah dipilih pada tahap sebelumnya. Pada simulasi dinamika molekuler digunakan algoritma LINCS dalam *force field* AMBER99SB-ILDN. Simulasi dilakukan selama 25 ns. Analisis terhadap perubahan struktur dapat dilihat dari nilai RMSD (Apol dkk, 2015). Visualisasi simulasi dinamika molekuler dapat dilihat melalui VMD versi 1.9.2 (Humphrey dkk, 1996).

BAB IV Hasil dan Pembahasan

IV.1 Pengumpulan Data

Protein uji yang digunakan dalam penelitian adalah protein *Isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) *Homo sapiens* yang terdiri dari 414 asam amino dengan penggantian Arginin menjadi Histidin pada urutan asam amino ke-132 sehingga disebut IDH1 (R132H). Perbedaan sekuens protein IDH1 dan IDH1 (R132H) adalah sebagai berikut:

IDH1

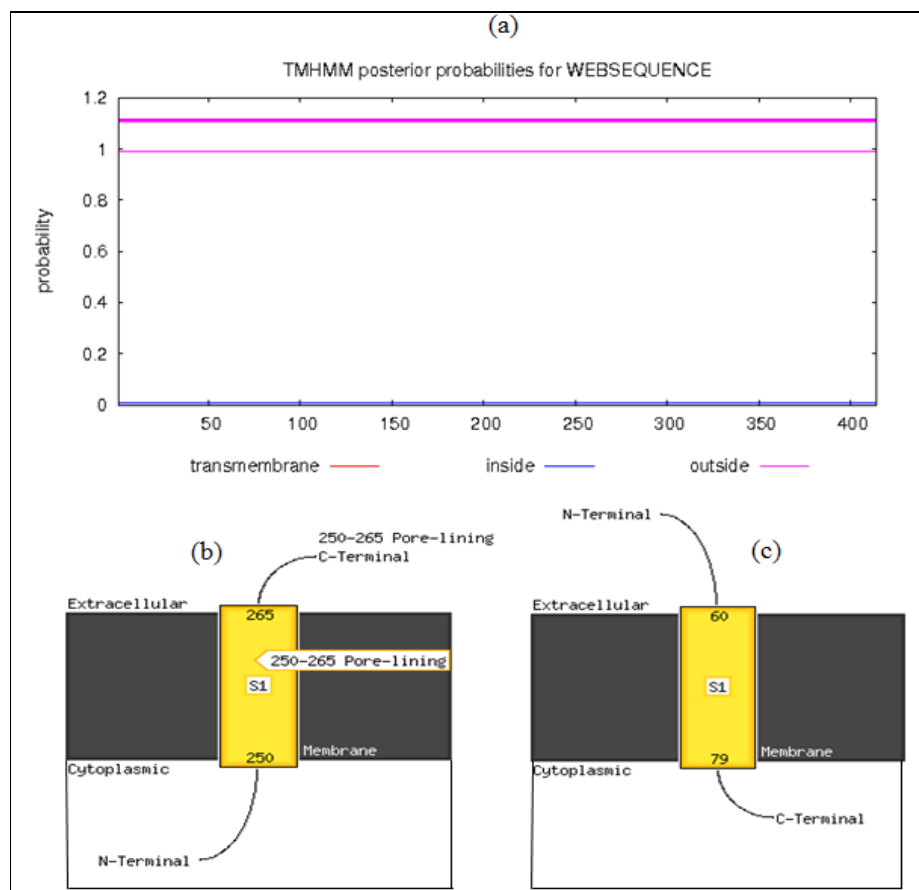
MSKKISGGSVVEMQGDEMTRIIWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIENRDA
TNDQVTKDAAEAIAKKHNVGVKCATITPDEKRVVEEFKLKQMWKSPNGTIR
NILGGTVFREAIICKNIPRLVSGWVKPIIIGRHAYGDQYRATDFVVPGPVKV
EMTYTPSDGTQKVITYLVHNFEEGGGVAMGMYNQDKSIEDFAHSSFQMA
LSKGWPLYLSTKNTILKKYDGRFKDIFQEIYDKQYKSQFEAQKIWYEHRLI
DDMVAQAMKSEGGFIWACKNYDGDVQSDSVAQGYGSLGMMTSVLVCP
DGKTVEAEAAHGTVTRHYRMYQKGQETSTNPIASIFAWTRGLAHRALD
NNKELAFFANALEEVSIETIEAGFMTKDLAACIKGLPNVQRSYDLNTFEFM
DKLGENLKIKLAQAKL

IDH1 (R132H)

MSKKISGGSVVEMQGDEMTRIIWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIENRDA
TNDQVTKDAAEAIAKKHNVGVKCATITPDEKRVVEEFKLKQMWKSPNGTIR
NILGGTVFREAIICKNIPRLVSGWVKPIIIGHHAYGDQYRATDFVVPGPVK
VEMTYTPSDGTQKVITYLVHNFEEGGGVAMGMYNQDKSIEDFAHSSFQM
ALSKGWPLYLSTKNTILKKYDGRFKDIFQEIYDKQYKSQFEAQKIWYEHRL
LIDDMVAQAMKSEGGFIWACKNYDGDVQSDSVAQGYGSLGMMTSVLV
CPDGKTVEAEAAHGTVTRHYRMYQKGQETSTNPIASIFAWTRGLAHRALD
LDNNKELAFFANALEEVSIETIEAGFMTKDLAACIKGLPNVQRSYDLNTFE
FMDKLGENLKIKLAQAKL

IV.2 Prediksi Topologi Transmembran

Prediksi topologi transmembran dari protein IDH1 (R132H) melalui TMHMM versi 2.0 menunjukkan bahwa protein ini bukanlah protein transmembran dengan seluruh asam amino berada di luar membran (Gambar IV.1). Namun prediksi topologi dengan menggunakan MEMSAT-SVM dan MEMSAT3 menyatakan bahwa protein IDH1 (R132H) merupakan protein transmembran dengan 1 domain (Gambar IV.1). Pada hasil MEMSAT-SVM, transmembran heliks protein IDH1 (R132H) dimulai dari asam amino 250 hingga asam amino 265 dengan N terminal berada di dalam sitoplasma dan C terminal di luar sel. Sementara itu, transmembran heliks protein IDH1 (R132H) dari hasil prediksi MEMSAT3 dimulai dari asam amino 60 hingga asam amino 79 dengan N terminal di luar sel dan C terminal di dalam sitoplasma.



Gambar IV.1 Hasil prediksi topologi transmembran protein IDH1 (R132H). (a) Hasil prediksi TMHMM; (b) Hasil prediksi MEMSAT-SVM; (c) Hasil prediksi MEMSAT3.

IV.3 Analisis Epitop

Pada hasil analisis epitop protein IDH1 (R132H) Pada NetMHCII versi 2.2, didapatkan 54 epitop dari 400 epitop yang terdiri dari 15 asam amino dan 132 epitop dari 395 epitop yang terdiri dari 20 asam amino yang memiliki ikatan kuat dengan MHC II alel HLA-DRB10101. Pada IEDB dihasilkan 400 epitop yang terdiri dari 15 asam amino yang diurutkan berdasarkan %Rank yang terendah. Epitop yang terdiri dari 15 asam amino dipilih dari hasil analisis IEDB dengan %Rank 4,72- 34,80. Epitop-epitop tersebut berjumlah 103 epitop yang mencakup 54 epitop dari hasil analisis NetMHCII. Epitop-epitop yang dipilih dari hasil analisis NetMHCII dan IEDB merupakan epitop yang memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan MHC II alel HLA-DRB10101 karena memiliki nilai $IC_{50} \leq 50$ nM.

IV.4 Prediksi Antigenisitas

Protein IDH1 (R132H) dan epitop-epitop yang memiliki ikatan kuat dengan MHC II diprediksi antigenisitasnya menggunakan VaxiJen dengan batas ambang 0,4. Hasil prediksi antigenisitas dari protein IDH1 (R132H) adalah 0,4175. Hal itu menandakan bahwa IDH1 (R132H) memiliki kemungkinan bersifat antigen tumor yang dapat merangsang sistem imun dengan meningkatkan ekspresi MHC. Oleh karena itu, epitop-epitop IDH1 (R132H) juga diprediksi memiliki kemungkinan bersifat antigen tumor. Dari hasil prediksi antigenisitas epitop-epitop didapatkan 91 epitop sebagai kandidat vaksin glioma dengan 39 epitop yang terdiri dari 15 asam amino (Tabel IV.1) dan 52 epitop yang terdiri dari 20 asam amino (Tabel IV.2).

Tabel IV.1 Hasil prediksi antigenisitas epitop dengan 15 asam amino

Epitop	No. Urutan	Urutan	*Level Ikatan	%Rank	Antigenisitas
1	138-152	QYRATDFVVP GPGKV	-	26,59	0,4389
2	139-153	YRATDFVVP GPGKVE	WB	25,47	0,6908
3	168-182	LVHNFEEGGGVAMGM	WB	33,79	0,6148
4	170-184	HNFEEGGGVAMGMYN	WB	33,04	0,5355
5	188-202	SIEDFAHSSSFQMALS	WB	34,16	0,5401
6	195-209	SSFQMALSKGWPLYL	SB	13,85	0,4615
7	196-210	SFQMALSKGWPLYLS	SB	18,48	0,4308

8	199-213	MALSKGWPLYLSTKN	WB	22,70	0,5470
9	201-215	LSKGWPLYLSTKNTI	WB	33,11	0,4111
10	203-217	KGWPLYLSTKNTILK	SB	4,77	0,6146
11	204-218	GWPLYLSTKNTILKK	SB	4,77	0,8423
12	205-219	WPLYLSTKNTILKKY	SB	4,99	0,5072
13	206-220	PLYLSTKNTILKKYD	SB	4,77	0,7993
14	207-221	LYLSTKNTILKKYDG	SB	14,48	0,7498
15	208-222	YLSTKNTILKKYDGR	SB	15,82	0,8281
16	248-262	HRLIDDMVAQAMKSE	SB	19,14	0,4444
17	249-263	RLIDDMVAQAMKSEG	SB	21,39	0,6415
18	250-264	LIDDMVAQAMKSEGG	SB	25,09	0,8248
19	298-312	PDGKTVEAEAAHGTV	WB	31,80	0,7478
20	299-313	DGKTVEAEAAHGTVT	SB	30,98	0,7949
21	300-314	GKTVEAEAAHGTVTR	SB	30,37	0,8594
22	301-315	KTVEAEAAHGTVTRH	SB	34,80	0,8471
23	331-345	ASIFAWTRGLAHRAK	SB	12,10	0,4307
24	332-346	SIFAWTRGLAHRAKL	SB	11,24	0,4796
25	334-348	FAWTRGLAHRAKLDN	SB	13,10	0,5955
26	346-360	LDNNKELAFFANALE	WB	25,76	0,5263
27	347-361	DNNKELAFFANALEE	WB	25,85	0,4730
28	348-362	NNKELAFFANALEEV	WB	22,54	0,5750
29	349-363	NKELAFFANALEEVS	WB	20,67	0,6779
30	350-364	KELAFFANALEEVS	WB	25,18	0,5368
31	351-365	ELAFFANALEEVSIE	WB	26,23	0,5377
32	352-366	LAFFANALEEVSIE	WB	33,37	0,4199
33	375-389	DLAACIKGLPNVQRS	WB	32,18	0,4634
34	376-390	LAACIKGLPNVQRSD	WB	32,14	0,6061
35	377-391	AACIKGLPNVQRSDY	WB	23,97	0,6345
36	378-392	ACIKGLPNVQRSDYL	WB	29,31	0,8135
37	394-408	TFEFMDKLGENLKI	WB	31,51	0,8761
38	395-409	FEFMDKLGENLKI	WB	34,17	0,7158
39	400-414	KLGENLKIQLAQAKL	WB	17,14	0,5284

*WB menandakan ikatan yang lemah dan SB menandakan ikatan yang kuat.

Tabel IV.2 Hasil prediksi antigenisitas epitop dengan 20 asam amino

Epitop	No. Urutan	Urutan	*Level Ikatan	Antigenisitas
40	2-21	SKKISGGSVVEMQGDEMTRI	SB	0,8460
41	3-22	KKISGGSVVEMQGDEMTRII	SB	0,7891
42	163-182	QKVTYLVHNFEEGGGVAMGM	SB	0,5788
43	164-183	KVTVTYLVHNFEEGGGVAMGMY	SB	0,5007
44	165-184	TYLVHNFEEGGGVAMGMYNQ	SB	0,5826
45	166-185	VTYLVHNFEEGGGVAMGMYN	SB	0,6549
46	188-207	SIEDFAHSSFQMALSKGWPL	SB	0,4550
47	192-211	FAHSSFQMALSKGWPLYLST	SB	0,4028
48	193-212	AHSSFQMALSKGWPLYLSTK	SB	0,4352
49	194-213	HSSFQMALSKGWPLYLSTKN	SB	0,4893
50	195-214	SSFQMALSKGWPLYLSTKNT	SB	0,4881

51	196-215	SFQMALSKGWPLYLSTKNTI	SB	0,4362
52	198-217	QMALSKGWPLYLSTKNTILK	SB	0,4890
53	199-218	MALSKGWPLYLSTKNTILKK	SB	0,4900
54	201-220	LSKGWPLYLSTKNTILKKYD	SB	0,6609
55	202-221	SKGWPLYLSTKNTILKKYDG	SB	0,5908
56	203-222	KGWPLYLSTKNTILKKYDGR	SB	0,6932
57	204-223	GWPLYLSTKNTILKKYDGRF	SB	0,8723
58	205-224	WPLYLSTKNTILKKYDGRFK	SB	0,8189
59	206-225	PLYLSTKNTILKKYDGRFKD	SB	0,7944
60	207-226	LYLSTKNTILKKYDGRFKDI	SB	1,0012
61	208-227	YLSTKNTILKKYDGRFKDIF	SB	0,8664
62	294-313	VLVCPDGKTVEAEAAHGTVT	SB	0,6171
63	295-314	LVCPCDGKTVEAEAAHGTVTR	SB	0,6817
64	296-315	VCPDGKTVEAEAAHGTVTRH	SB	0,6807
65	297-316	CPDGKTVEAEAAHGTVTRHY	SB	0,7343
66	298-317	PDGKTVEAEAAHGTVTRHYR	SB	0,8533
67	319-338	YQKGQETSTNPIASIFAWTR	SB	0,6890
68	320-339	QKGQETSTNPIASIFAWTRG	SB	0,6845
69	321-340	KGQETSTNPIASIFAWTRGL	SB	0,4881
70	323-342	QETSTNPIASIFAWTRGLAH	SB	0,4133
71	324-343	ETSTNPIASIFAWTRGLAHR	SB	0,4428
72	325-344	TSTNPIASIFAWTRGLAHRA	SB	0,4196
73	326-345	STNPIASIFAWTRGLAHRAK	SB	0,5182
74	327-346	TNPIASIFAWTRGLAHRAKL	SB	0,5567
75	329-348	PIASIFAWTRGLAHRAKLDN	SB	0,4040
76	333-352	IFAWTRGLAHRAKLDNNKEL	SB	0,4612
77	334-353	FAWTRGLAHRAKLDNNKELA	SB	0,5181
78	335-354	AWTRGLAHRAKLDNNKELAF	SB	0,5482
79	336-355	WTRGLAHRAKLDNNKELAFF	SB	0,5137
80	343-362	RAKLDNNKELAFFANALEEV	SB	0,8576
81	344-363	AKLDNNKELAFFANALEEVS	SB	0,8295
82	345-364	KLDNNKELAFFANALEEVS	SB	0,4931
83	346-365	LDNNKELAFFANALEEVSIE	SB	0,4506
84	347-366	DNNKELAFFANALEEVSIE	SB	0,4272
85	371-390	FMTKDLAACIKGLPNVQRSD	SB	0,5216
86	372-391	MTKDLAACIKGLPNVQRSDY	SB	0,5605
87	373-392	TKDLAACIKGLPNVQRSDYL	SB	0,6894
88	389-408	SDYLNTFEFMDKLGKIK	SB	1,0555
89	390-409	DYLNTFEFMDKLGKIKL	SB	0,8315
90	391-410	YLNTFEFMDKLGKIKLA	SB	0,7253
91	395-414	FEFMDKLGKIKLAQAKL	SB	0,5803

*WB menandakan ikatan yang lemah dan SB menandakan ikatan yang kuat.

IV.5 Homology modeling

Pada hasil identifikasi dan *alignment* epitop-epitop kandidat vaksin glioma dengan protein-protein yang ada dalam *database* PDB dengan menggunakan

BLASTP[®] didapatkan 2 *template* untuk masing-masing epitop. Dua *template* tersebut memiliki persentase *query cover alignment* dengan epitop sebesar 100%, keidentikan 100% dan *E-value* yang terkecil dari semua *alignment* sekuens *database* (Tabel IV.3).

Tabel IV.3 Kode PDB *template* epitop hasil BLASTP[®]

Epitop	Template 1	Template 2	Epitop	Template 1	Template 2
1	2CMJ:A	5DE1:A	47	2CMJ:A	5DE1:A
2	2CMJ:A	5DE1:A	48	2CMJ:A	5DE1:A
3	5DE1:A	1T09:A	49	2CMJ:A	5DE1:A
4	5DE1:A	1T09:A	50	2CMJ:A	5DE1:A
5	2CMJ:A	5DE1:A	51	2CMJ:A	5DE1:A
6	2CMJ:A	5DE1:A	52	2CMJ:A	5DE1:A
7	2CMJ:A	5DE1:A	53	2CMJ:A	5DE1:A
8	2CMJ:A	5DE1:A	54	2CMJ:A	5DE1:A
9	2CMJ:A	5DE1:A	55	2CMJ:A	5DE1:A
10	2CMJ:A	5DE1:A	56	2CMJ:A	5DE1:A
11	2CMJ:A	5DE1:A	57	2CMJ:A	5DE1:A
12	2CMJ:A	5DE1:A	58	2CMJ:A	5DE1:A
13	2CMJ:A	5DE1:A	59	2CMJ:A	5DE1:A
14	2CMJ:A	5DE1:A	60	2CMJ:A	5DE1:A
15	2CMJ:A	5DE1:A	61	2CMJ:A	5DE1:A
16	2CMJ:A	5DE1:A	62	5DE1:A	1T09:A
17	2CMJ:A	5DE1:A	63	5DE1:A	1T09:A
18	2CMJ:A	5DE1:A	64	5DE1:A	1T09:A
19	2CMJ:A	5DE1:A	65	2CMJ:A	5DE1:A
20	4HCX:A	2CMJ:A	66	2CMJ:A	5DE1:A
21	4HCX:A	2CMJ:A	67	5DE1:A	1T09:A
22	4HCX:A	2CMJ:A	68	5DE1:A	1T09:A
23	5DE1:A	1T09:A	69	5DE1:A	1T09:A
24	5DE1:A	1T09:A	70	5DE1:A	1T09:A
25	5DE1:A	1T09:A	71	5DE1:A	1T09:A
26	5DE1:A	1T09:A	72	5DE1:A	1T09:A
27	5DE1:A	1T09:A	73	5DE1:A	1T09:A
28	5DE1:A	1T09:A	74	5DE1:A	1T09:A
29	5DE1:A	1T09:A	75	5DE1:A	1T09:A
30	5DE1:A	1T09:A	76	5DE1:A	1T09:A
31	5DE1:A	1T09:A	77	5DE1:A	1T09:A
32	5DE1:A	1T09:A	78	5DE1:A	1T09:A
33	2CMJ:A	5DE1:A	79	5DE1:A	1T09:A
34	2CMJ:A	5DE1:A	80	5DE1:A	1T09:A
35	2CMJ:A	5DE1:A	81	5DE1:A	1T09:A
36	2CMJ:A	5DE1:A	82	5DE1:A	1T09:A
37	5DE1:A	1T09:A	83	5DE1:A	1T09:A
38	5DE1:A	1T09:A	84	5DE1:A	1T09:A

39	5DE1:A	1T09:A	85	2CMJ:A	5DE1:A
40	5DE1:A	1T09:A	86	2CMJ:A	5DE1:A
41	5DE1:A	1T09:A	87	2CMJ:A	5DE1:A
42	5DE1:A	1T09:A	88	5DE1:A	1T09:A
43	5DE1:A	1T09:A	89	5DE1:A	1T09:A
44	5DE1:A	1T09:A	90	5DE1:A	1T09:A
45	5DE1:A	1T09:A	91	5DE1:A	1T09:A
46	2CMJ:A	5DE1:A			

Multiple alignment epitop dengan kedua *template*-nya juga dilakukan dengan menggunakan Clustal Omega versi 1.2.1 yang kemudian akan digunakan untuk *homology modeling* dengan I-TASSER. Hasil *Multiple alignment* dari epitop 1 dengan *template* 2CMJ chain A dan 5DE1 chain A dapat dilihat pada Gambar IV.2. Seluruh sekuens epitop 1 tersejajarkan dengan asam amino 194-208 dari *template* 2CMJ chain A dan asam amino 196-210 dari *template* 5DE1 chain A.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment					
gi 943352226 pdb 5DE1 A	SKKISGGSVVEMQGD	EMTRI	IWELIKE	LIFPYVELDLHSYDLGIENRDATNDQVTKDAA	60
Homo	-----				0
gi 149241012 pdb 2CMJ A	--KIQGGSVVEMQGD	EMTRI	IWELIKE	LILPYVELDLHSYDLGIENRDATNDQVTKDAA	58
gi 943352226 pdb 5DE1 A	EAIKKHNVGVKCATIT	PDEKRV	EFKLKQ	MMKSPNGTIRN	120
Homo	-----				0
gi 149241012 pdb 2CMJ A	EAIKKYNVGVKCATIT	PDEKRV	EFKLKQ	MMKSPNGTIRN	118
gi 943352226 pdb 5DE1 A	SGWVKPIIIGHHAYGD	QYRATD	FVVP	GGPKVEITYTPSDGTQKV	180
Homo	-----				15
gi 149241012 pdb 2CMJ A	TGWVKPIIIGRHAYGD	QYRATD	FVVP	GGPKVEITYTPKDG	178

gi 943352226 pdb 5DE1 A	MYNQDKSIEDFAHSS	FQ	MA	LSKGWPLYLSTKNTILK	240
Homo	-----				15
gi 149241012 pdb 2CMJ A	MYNQDKSIEDFAHSS	FQ	MA	LSKGWPLYLSTKNTILK	238
gi 943352226 pdb 5DE1 A	QKIWYEHRLIDDMVA	QAMK	SEGGFI	WACKNYDGDVQSDS	300
Homo	-----				15
gi 149241012 pdb 2CMJ A	QNICYEHRLIDDMVA	QAMK	SEGGFI	WACKNYDGDVQSDS	298
gi 943352226 pdb 5DE1 A	TVEAAAHGTVIRHYR	MYQKQ	QETSTN	PIASIFAWTRGLA	360
Homo	-----				15
gi 149241012 pdb 2CMJ A	TVEAAAHGTVIRHYR	MYQKQ	QETSTN	PIASIFAWSRGLA	358
gi 943352226 pdb 5DE1 A	VSIETIEAGFMTKDL	AACIKGL	PNVQR	SDYLNTFEFMDKL	413
Homo	-----				15
gi 149241012 pdb 2CMJ A	VCIETIEAGFMTKDL	AACIKGL	PNVQR	SDYLNTFEFMDKL	410

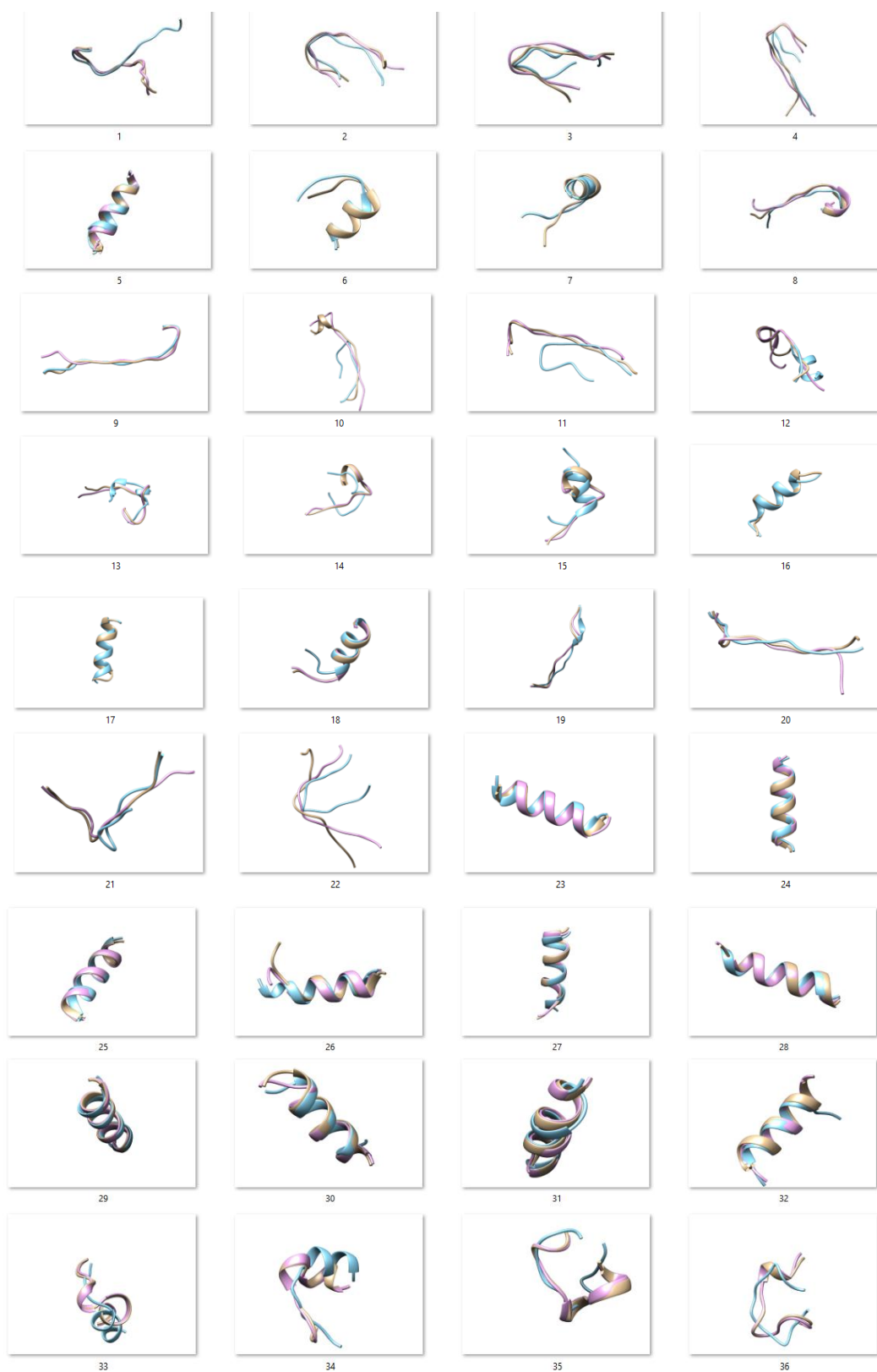
Gambar IV.2 Hasil *multiple alignment* epitop 1 dengan *template* 2CMJ:A dan 5DE1:A.

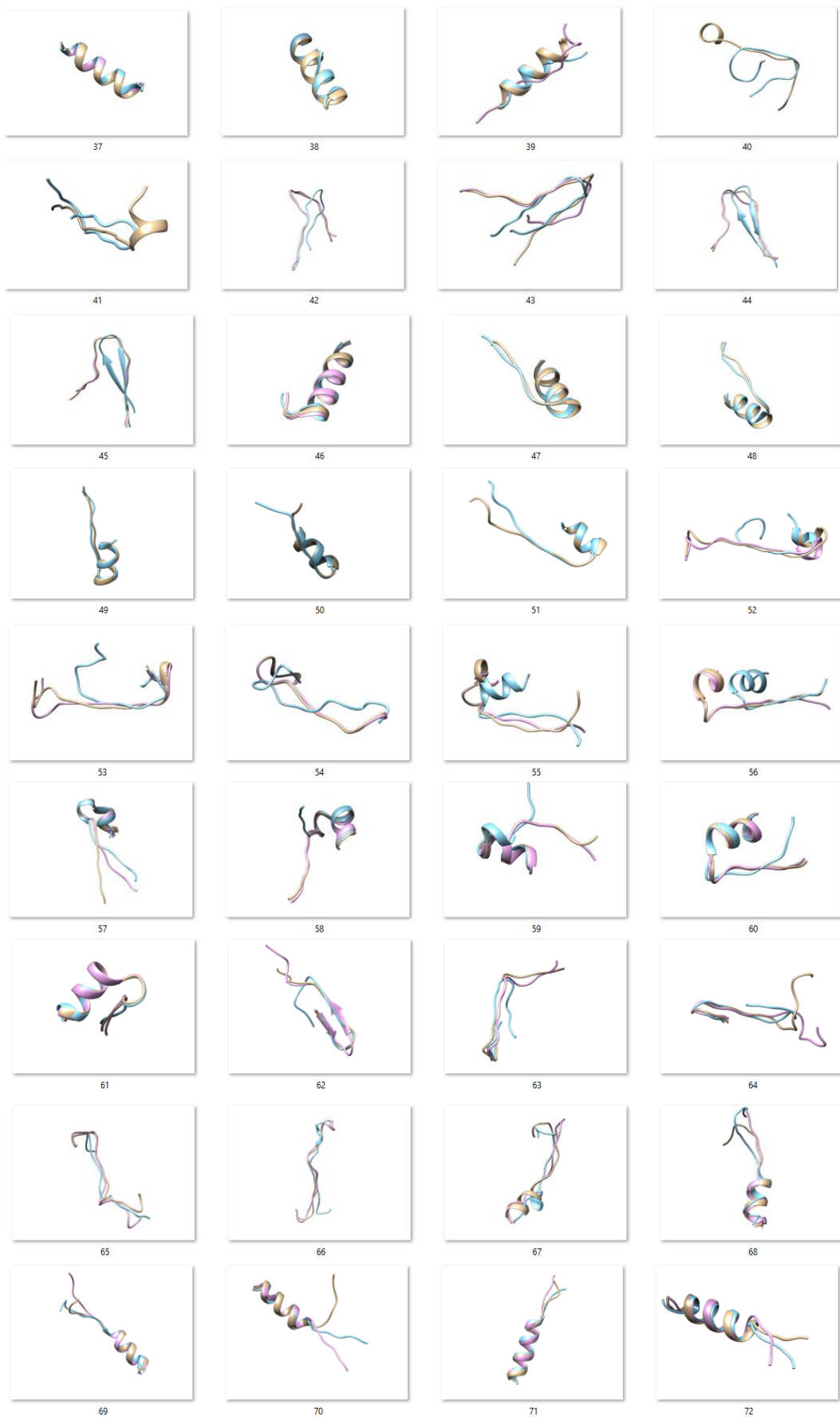
Homology modeling untuk 91 epitop dilakukan dengan menggunakan 3 perangkat lunak, yaitu Modeller versi 9.15, I-TASSER dan (PS)² versi 2.0 (Gambar IV.3). Digunakan 3 perangkat lunak untuk *homology modeling* protein karena adanya perbedaan metode atau pendekatan yang diterapkan.

Modeller digunakan untuk *homology modeling* atau *modeling* komparatif struktur 3D protein (Marti-Renom dkk, 2000; Webb dan Sali, 2014). Dalam menggunakan Modeller, suatu *alignment* sekuens harus disiapkan untuk pemodelan dengan struktur-struktur yang telah diketahui berhubungan dan Modeller secara otomatis akan mengkalkulasi suatu model yang mengandung semua atom non-hidrogen. Modeller mengimplementasikan *modeling* komparatif struktur protein dengan *satisfaction spatial restraints* (Sali dan Blundell, 1993; Fiser dkk, 2000).

I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) merupakan aplikasi *on-line* untuk memprediksi struktur 3D protein dengan kualitas yang tinggi dari sekuens asam amino. *Template* struktural diidentifikasi dari PDB dengan pendekatan *multiple threading*, LOMETS. Informasi *template* yang spesifik dengan *alignment* dapat ditambahkan untuk menjadi target *template*. Kemudian pemodelan dilakukan dengan simulasi *iterative threading assembly* yang diperluas untuk anotasi fungsi berbasis struktur dengan mencocokkan prediksi struktur dengan *template* fungsional yang telah diketahui (Yang dkk, 2015).

(PS)² merupakan *server homology modeling* otomatis. Metode yang digunakan adalah substitusi matriks baru (S2A2) yang mengkombinasi dua sekuens dan informasi struktur sekunder untuk mendeteksi protein-protein homolog berdasarkan keidentikan dan *alignment* target *template*. Pada akhirnya struktur 3D protein dibangun dengan menggunakan *package* Modeller (Chen dkk, 2009). Oleh karena itu jika membandingkan struktur 3D epitop hasil *homology modeling* dari ketiga perangkat yang digunakan, maka hasil Modeller mirip dengan hasil (PS)².







Gambar IV.3 Hasil *homology modeling* 91 epitop dengan Modeller (Coklat), I-TASSER (Biru), dan (PS)² (Ungu).

Pada hasil *homology modeling* epitop 6, 7, 16, 17, 38, 40, 41, 47, 48, 49, 50, 51, 90 dan 91 tidak ada model 3D (PS)² karena dari hasil persentase *alignment* oleh (PS)² tidak 100%. Hal itu membuat sekuens asam amino epitop yang tidak ter-*alignment* tidak dibuat bentuk 3D-nya. Persentase *alignment* tersebut terjadi karena pemilihan template berdasarkan hasil terbaik BLASTP[®] yang tidak sesuai dengan template yang dipilih otomatis oleh (PS)² dimana pemilihannya berdasarkan atas konsensus PSI-BLAST dan IMPALA (Chen dkk, 2006).

IV.6 Validasi Model

Model 3D epitop hasil *homology modeling* Modeller, I-TASSER dan (PS)² divalidasi dengan menggunakan MolProbity, ProSA-web dan QMEAN. Dari hasil

validasi dapat dipilih model epitop terbaik untuk masing-masing epitop 1 hingga 91 (Tabel IV.4).

Tabel IV.4 Hasil validasi model 3D epitop

Epitop	*Model	<i>Clash Score</i> (Å)	<i>Poor Rotamers</i> (%)	<i>Ramachandran Favored</i> (%)	<i>MolProbity Score</i> (Å)	<i>Z-score</i>	<i>QMEAN Score</i>
1	M	21,46	0,00	100,00	1,82	-0,79	0,999
2	M	12,99	0,00	100,00	1,62	-0,04	0,911
3	M	28,99	0,00	100,00	1,95	0,01	0,620
4	M	19,32	0,00	100,00	1,78	-1,83	0,132
5	M	13,45	0,00	100,00	1,64	-1,50	0,674
6	M	28,57	0,00	100,00	1,94	-1,65	1,028
7	M	4,08	0,00	100,00	1,19	-1,40	1,113
8	M	8,10	0,00	100,00	1,44	-0,78	0,449
9	M	7,91	7,14	92,31	2,55	-1,08	0,533
10	M	30,30	7,14	100,00	2,61	-0,91	0,518
11	M	26,52	0,00	100,00	1,91	-0,52	0,525
12	I	0	20,00	69,23	2,34	-1,90	0,525
13	M	22,56	13,33	92,31	3,17	-0,29	0,727
14	P	15,44	0,00	92,31	2,17	0,10	0,667
15	I	0	0,00	46,15	1,49	-1,13	0,799
16	M	12,45	0,00	100,00	1,61	-0,64	0,335
17	M	25,97	0,00	100,00	1,90	-0,55	0,396
18	M	28,04	0,00	100,00	1,93	-0,78	0,587
19	M	19,80	0,00	100,00	1,79	0,16	0,881
20	M	9,90	0,00	92,31	1,99	-0,02	0,805
21	M	4,67	0,00	100,00	1,24	-0,13	0,694
22	M	0	9,09	92,31	1,70	0,37	0,905
23	M	12,30	10,00	92,31	2,84	-0,94	0,413
24	I	0	0,00	100,00	0,50	-0,95	0,601
25	P	24,10	0,00	100,00	1,87	-0,96	0,735
26	I	0	0,00	100,00	0,50	-1,25	0,651
27	I	0	8,33	100,00	1,20	-0,97	0,506
28	P	8,47	8,33	100,00	2,16	-1,57	0,599
29	I	0	0,00	100,00	0,50	-1,60	0,735
30	I	0	8,33	84,62	1,87	-0,95	0,560
31	M	17,32	0,00	92,31	2,21	-1,43	0,627
32	M	34,78	0,00	100,00	2,02	-0,46	0,546
33	P	8,77	0,00	100,00	1,47	-1,06	0,579
34	P	17,54	0,00	100,00	1,74	-0,55	0,679

35	M	34,78	0,00	100,00	2,02	-0,05	0,705
36	P	33,47	0,00	100,00	2,01	0,41	1,048
37	P	19,23	0,00	100,00	1,78	-1,52	0,471
38	M	60,38	7,14	100,00	2,90	-0,81	0,543
39	M	3,86	8,33	100,00	1,87	-1,22	0,579
40	M	39,74	5,88	100,00	2,66	-2,00	0,507
41	M	25,81	0,00	100,00	1,90	-2,06	0,637
42	P	10,10	0,00	94,44	1,90	-0,84	0,101
43	P	16,61	0,00	100,00	1,72	-1,03	0,079
44	I	0	13,33	72,22	2,18	-0,29	0,184
45	I	3,42	0,00	77,78	1,90	-0,28	0,148
46	I	0	5,88	100,00	1,08	-2,06	0,664
47	M	37,85	0,00	100,00	2,06	-1,82	0,591
48	I	0	5,88	83,33	1,77	-2,24	0,677
49	I	0	0,00	83,33	1,19	-2,24	0,445
50	M	9,38	0,00	100,00	1,50	-1,30	0,623
51	M	12,20	0,00	100,00	1,60	-1,21	0,710
52	I	2,97	0,00	55,56	2,03	-1,38	0,425
53	M	67,06	11,11	94,44	3,47	-1,88	0,474
54	M	20,06	0,00	88,89	2,38	-0,64	0,523
55	M	41,54	0,00	94,44	2,48	-1,32	0,274
56	I	0	11,11	72,22	2,12	-2,28	0,673
57	M	28,74	0,00	94,44	2,32	-0,86	0,337
58	P	19,28	0,00	94,44	2,16	-0,73	-0,002
59	I	2,86	10,53	72,22	2,67	-0,58	0,279
60	P	33,71	5,26	94,44	2,94	0,36	0,261
61	P	47,62	21,05	94,44	3,54	0,69	0,368
62	I	3,61	0,00	77,78	1,91	0,52	0,820
63	P	13,99	6,67	100,00	2,28	0,49	0,654
64	M	24,65	0,00	94,44	2,26	0,46	0,798
65	M	24,22	0,00	100,00	1,87	-0,24	0,823
66	M	19,87	6,67	94,44	2,80	1,11	0,600
67	M	15,62	0,00	100,00	1,70	-0,59	0,549
68	M	26,14	0,00	100,00	1,91	0,19	0,486
69	M	19,48	0,00	100,00	1,79	-0,33	0,445
70	I	0	18,75	66,67	2,34	-0,32	0,329
71	P	15,97	0,00	100,00	1,71	-0,53	0,364
72	M	25,97	0,00	100,00	1,90	-1,36	0,254
73	P	31,65	0,00	100,00	1,98	-1,21	0,361
74	M	40,12	0,00	100,00	2,08	-1,00	0,296
75	I	3,12	26,67	100,00	2,19	-1,54	0,273
76	M	41,42	0,00	100,00	2,10	-1,53	0,532

77	M	21,28	0,00	100,00	1,82	-1,27	0,727
78	M	24,32	6,67	100,00	2,50	-1,27	0,731
79	P	50,15	0,00	100,00	2,18	-0,65	0,824
80	I	0	12,50	88,89	1,91	-1,64	0,467
81	P	9,68	0,00	94,44	1,89	-1,15	0,761
82	M	31,35	0,00	100,00	1,98	-1,23	0,545
83	M	16,03	0,00	100,00	1,71	-1,27	0,652
84	P	35,83	0,00	100,00	2,04	-0,79	0,591
85	P	38,34	5,88	100,00	2,65	-0,65	0,532
86	I	0	5,88	100,00	1,08	-0,86	0,396
87	P	22,15	0,00	100,00	1,84	-1,68	0,236
88	M	35,61	0,00	100,00	2,03	-1,94	0,410
89	M	20,29	0,00	100,00	1,80	-2,00	0,410
90	I	2,92	0,00	100,00	1,08	-1,40	0,398
91	M	11,66	0,00	100,00	1,58	-0,86	0,569

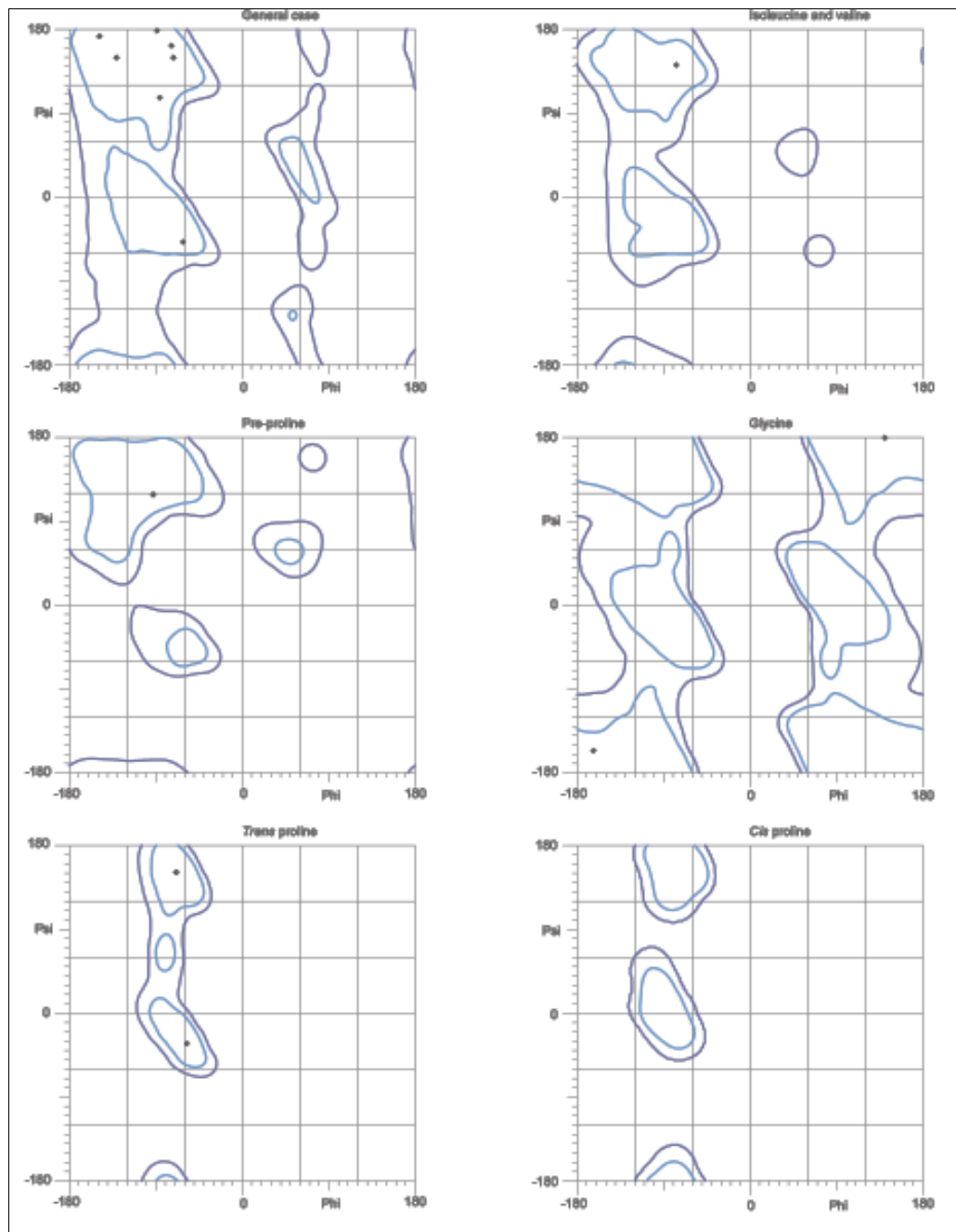
*M = Modeller, I = I-TASSER dan P = (PS)²

Dalam validasi model epitop, ada beberapa aspek yang perlu dipertimbangkan, yaitu kedudukan residu, interaksi antar residu dan atom yang menyusun residu tersebut (Pitman dan Menz, 2006). Pada MolProbity, validasi interaksi sterik semua atom dalam residu ditunjukkan oleh *Clash Score*. *Clash score* adalah jumlah benturan per 1000 atom. Semakin kecil *Clash Score*, maka model semakin baik (Davis dkk, 2004). Model 3D epitop diharapkan memiliki *Clash Score* < 0,4 Å.

Analisis geometri juga merupakan indikator yang menentukan baik atau buruk suatu model. *Ramachandran Favored* dan *Poor Rotamer* merupakan parameter yang dapat digunakan untuk analisis geometri model epitop. Nilai *Ramachandran Favored* epitop 1 adalah 100% untuk 13/13 residu. Residu pertama dan terakhir tidak masuk ke dalam evaluasi. Model epitop dapat dikatakan baik karena memiliki *Ramachandran Favored* > 98%, *Ramachandran Allowed* > 99,8% dan *Ramachandran Outliers* < 0,2% (Gambar IV.4). *Poor Rotamer* digunakan untuk melihat letak distribusi multidimensi residu. Suatu residu dikatakan *Poor Rotamer* apabila memiliki sudut χ rotamer rantai cabang di bawah 1% dari set level nilai χ . Model yang baik adalah model yang memiliki *Poor Rotamer* < 0,3%. Model epitop 1 memiliki kualitas baik karena memiliki persentase *Poor Rotamer* 0,00% dan *MolProbity Score* < 2 Å. *MolProbity Score* merupakan nilai kombinasi dari

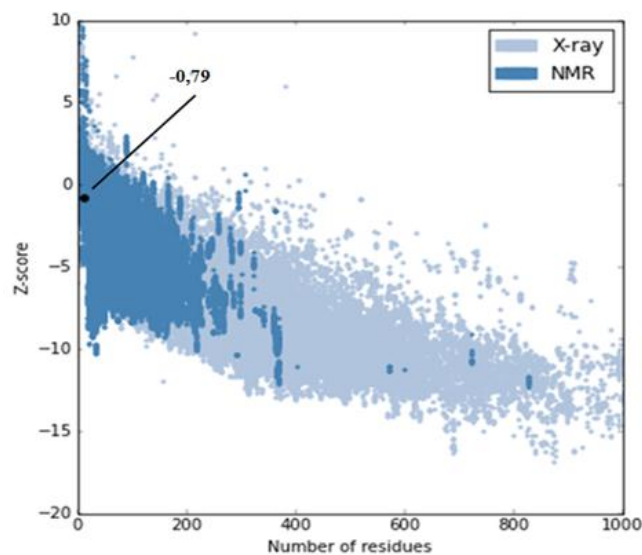
Clash Score, Poor Rotamer dan Ramachandran Favored. Hal itu dapat dilihat pada persamaan berikut (Chen dkk, 2009):

$$\text{MolProbity Score} = 0,42574 \times \log (1 + \text{Clash Score}) + 0,32996 \times \log (1 + \max (0, \text{pctRotOut} - 1)) + 0,24979 \times \log (1 + \max (0, 100 - \text{pctRamaFavored} - 2)) + 0,5$$



Gambar IV.4 Plot Ramachandran epitop 1 hasil *homology modeling* Modeller.

ProSA (*Protein Structure Analysis*) digunakan untuk mengevaluasi akurasi model protein. Analisis yang dilakukan berdasarkan analisis statistik dari struktur-struktur protein hasil eksperimen, baik dengan kristalografi sinar-X maupun spektroskopi NMR dalam PDB. Hasil validasi struktur 3D epitop dengan ProSA adalah berupa *Z-score*. Struktur 3D epitop dikatakan akurat apabila memiliki *Z-score* yang masuk ke dalam *range Z-score* struktur protein hasil eksperimen (Wiederstein dan Sippl, 2007). Pada epitop 1 dihasilkan *Z-score* sebesar -0,79 yang masuk ke dalam *range Z-score* struktur protein hasil eksperimen dengan spektroskopi NMR (Gambar IV.5).



Gambar IV.5 Plot *Z-score* struktur epitop 1 hasil *homology modeling* Modeller pada ProSA-web.

Fungsi skoring QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) memperkirakan kualitas global model berdasarkan kombinasi linier dari 6 deskriptor struktural. Empat dari deskriptor tersebut merupakan rata-rata potensial statistik, yaitu geometri lokal yang dianalisis dengan potensial sudut torsi 3 asam amino yang berurutan, 2 potensial interaksi yang bergantung pada jarak berdasarkan atom C_{β} dengan semua atom, dan potensial solvasi. Dua deskriptor lain mencerminkan kesepakatan antara kalkulasi dan prediksi struktur sekunder serta aksesibilitas pelarut. QMEAN Score 0-1 mencerminkan reliabilitas model global yang diprediksi (Benkert dkk, 2010).

IV.7 Refinement

Refinement model epitop yang telah dipilih dari hasil validasi dilakukan menggunakan GalaxyRefine dan GROMACS versi 5.0.6. Pada evaluasi dengan GalaxyRefine, akurasi struktur global dan lokal dirubah. GalaxyRefine awalnya membangun kembali konformasi semua rantai samping dan merelaksasi struktur secara berulang melalui simulasi dinamika molekular pendek, yaitu selama 0,6 dan 0,8 ps dengan step waktu 4 fs setelah perturbasi struktur (Heo dkk, 2013).

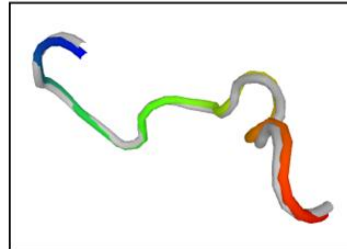
Nilai GDT-HA dan RMSD digunakan untuk pengukuran akurasi struktur global. Sementara *MolProbity Score* digunakan untuk pengukuran akurasi struktur lokal hasil *refinement*. GDT-HA (*Global Distance Test High Accuracy*) adalah ukuran kualitas global akurasi tinggi dari perbaikan posisi backbone multi-superposisi struktur dengan menghitung persentase rata-rata jarak residu dengan atom C_{α} dari struktur hasil eksperimen dengan *range* 0-1. Semakin tinggi nilai GDT-HA menandakan akurasi yang lebih baik. Berbeda dengan GDT-HA, nilai RMSD yang lebih rendah menandakan akurasi yang lebih baik. Pada pengukuran akurasi struktur lokal, *MolProbity Score* yang lebih rendah menandakan model yang lebih realistik secara fisika sebagaimana telah dijelaskan pada bagian validasi model (Lee dkk, 2015).

Hasil *refinement* dari GalaxyRefine untuk epitop 1 dapat dilihat pada Tabel IV.5. Dari tabel tersebut, model 1 hingga model 5 memiliki struktur yang lebih baik dari *initial* (model awal) dilihat dari *MolProbity Score*. Model 1 dan model 5 memiliki *MolProbity Score* terendah dan nilai GDT-HA tertinggi. Namun, model yang dipilih untuk epitop 1 adalah model 5 karena memiliki RMSD lebih rendah dari RMSD model 1. Pada GalaxyRefine dapat dilihat pula visualisasi perbandingan struktur 3D dari struktur *initial* dan model 5 (Gambar IV.6).

Tabel IV.5 Informasi struktur hasil *refinement* epitop 1 dengan GalaxyRefine

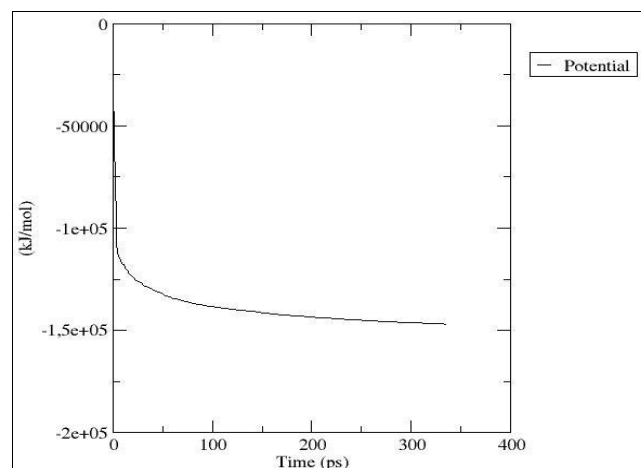
Model	GDT-HA	RMSD (Å)	<i>MolProbity Score</i> (Å)	<i>Clash Score</i> (Å)	<i>Poor Rotamers</i> (%)	<i>Ramachandran Favored</i> (%)
<i>Initial</i>	1,000	0,000	1,825	21,5	0,0	100,0
Model 1	0,9500	0,439	0,500	0,0	0,0	100,0

Model 2	0,9333	0,437	1,200	0,0	8,3	100,0
Model 3	0,9333	0,322	1,200	0,0	8,3	100,0
Model 4	0,9333	0,321	1,200	0,0	8,3	100,0
Model 5	0,9500	0,401	0,500	0,0	0,0	100,0



Gambar IV.6 Visualisasi struktur 3D *initial* (abu-abu) dan model 5 (berwarna) hasil *refinement* GalaxyRefine.

Model yang telah dipilih dari hasil *refinement* GalaxyRefine diminimisasi energinya dengan menggunakan GROMACS versi 5.0.6. Tujuan dari minimisasi energi sebelum dilakukan studi *docking* adalah untuk menghilangkan energi konfigurasi yang terlampau tinggi karena benturan sterik atau ikatan yang jauh dari keadaan equilibrium yang dapat menyebabkan perturbasi non-fisik dan ketidakstabilan dari *docking* (Pitman dan Menz, 2006). Keadaan energi yang rendah menyebabkan struktur epitop lebih stabil. Pada Gambar IV.7 dapat dilihat penurunan energi epitop 1 setelah minimisasi.



Gambar IV.7 Grafik minimisasi energi struktur 3D epitop 1 dengan GROMACS.

Model hasil minimisasi energi inilah yang menjadi model akhir untuk kemudian dilakukan *docking* terhadap reseptor. Pada Gambar IV.8 dapat dilihat perbedaan

struktur 3D dari model akhir epitop 1 dengan IDH1 (R132H) dari PDB dengan kode PDB 4UMX. Nilai RMSD dari epitop 1 dan IDH1 (R132H) adalah 0,086 Å.

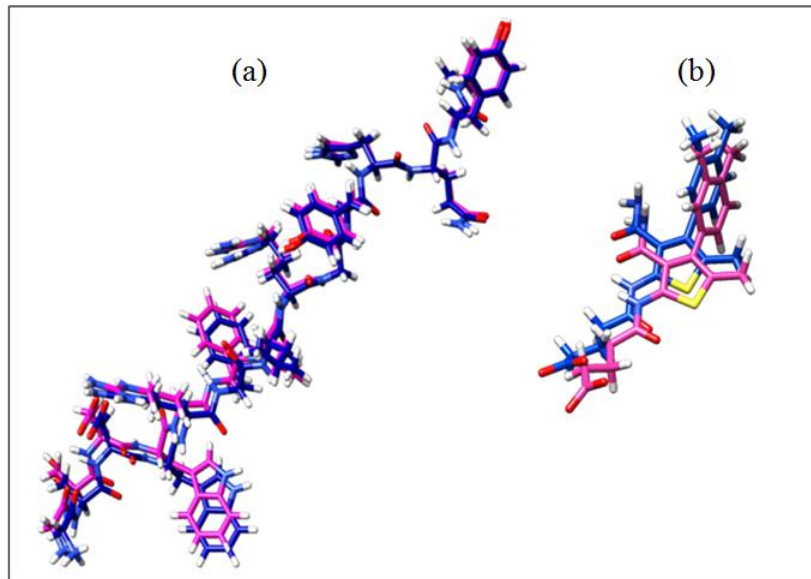


Gambar IV.8 Perbandingan struktur 3D dari epitop 1 (hijau) dengan IDH1 (R132H) (merah muda).

IV.8 Studi *Docking*

Studi *docking* dilakukan pada 91 struktur 3D epitop hasil *refinement* untuk melihat aktivitasnya terhadap reseptor. Studi *docking* dilakukan dengan menggunakan Dock versi 6.7. Metode *docking* yang digunakan adalah metode *rigid body docking* dimana epitop atau ligan dan reseptor diperlakukan dalam keadaan *rigid*. Pada proses *docking* dengan Dock terdapat beberapa tahap, yaitu persiapan reseptor dan ligan, pembuatan *spheres*, seleksi *spheres*, pembuatan *box*, pembuatan *grid*, dan *docking*.

Sebelum dilakukan studi *docking* epitop terhadap reseptor, dilakukan *redocking* terlebih dahulu antara reseptor dengan ligan alaminya pada PDB (Gambar IV.9). Ligan alami MHC II HLA DRB1 0101 adalah peptida A2 dan ligan alami EphA3 adalah senyawa 164. *Redocking* dilakukan untuk memvalidasi metode *docking* yang digunakan. Dari hasil *redocking* didapatkan nilai RMSD untuk MHC II HLA DRB1 0101 dengan peptida A2 sebesar 0,7371 Å dan untuk reseptor EphA3 dengan senyawa 164 sebesar 1,2801 Å. Nilai RMSD tersebut < 2 Å. Hal ini menunjukkan bahwa metode tersebut dapat digunakan untuk skrining virtual dengan menggunakan epitop.



Gambar IV.9 Perbandingan sebelum (biru) dan sesudah (merah muda) *redocking* reseptor dengan ligan alaminya. (a) Ligan alami MHC II HLA DRB1 0101, peptida A2; (b) dan ligan alami EphA3, senyawa 164.

Aktivitas epitop untuk pencegahan glioma diketahui dari hasil *docking* terhadap MHC II HLA DRB1 0101 (Tabel IV.6). Sedangkan aktivitas epitop untuk pengobatan glioma diketahui dari hasil *docking* terhadap reseptor EphA3 (Tabel IV.7). Pada hasil *docking* didapatkan *Grid Score*. *Grid Score* merupakan hasil penjumlahan energi Van der Waals dan energi elektrostatis. *Grid Score* yang semakin negatif mengindikasikan ikatan yang semakin baik antara epitop dengan reseptor.

Dari hasil *docking* epitop dengan MHC II HLA DRB1 0101 didapatkan *Grid Score* yang paling negatif pada epitop 42, yaitu $-62,73$ kkal/mol dengan 7 ikatan hidrogen (Gambar IV.10). Meskipun *Grid Score* tersebut tidak lebih negatif dibandingkan *Grid Score* hasil *redocking* peptida A2 terhadap MHC II HLA DRB1 0101, epitop 42 tetap memiliki kemungkinan menjadi kandidat baru vaksin profilaktik glioma karena peptida A2 merupakan peptida endogen yang digunakan pada studi ini hanya untuk mengetahui sisi aktif dari MHC II HLA DRB1 0101 (Murthy dan Stern, 1997). Sementara itu, dari hasil *docking* epitop dengan reseptor EphA3 didapatkan *Grid Score* yang paling negatif pada epitop 54, yaitu $-55,56$ kkal/mol dengan 11 ikatan hidrogen (Gambar IV.10). *Grid Score* tersebut

juga lebih negatif dibandingkan *Grid Score* hasil *redocking* senyawa 164 terhadap reseptor EphA3.

Tabel IV.6 Hasil *docking* epitop dengan MHC II HLA DRB1 0101

Epitop	<i>Grid Score</i> (kkal/mol)	Jumlah Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrogen	Jarak (Å)
Peptida A2	-78,66	11	*A:ARG:H - B:ASN:OD1 A:ARG:HH11 - B:THR:O A:GLN:HE22 - B:ASP:OD2 A:TYR:H - B:ASP:OD1 B:TRP:HE1 - A:HIS:O B:ARG:HH22 - A:ARG:O B:HIS:HE2 - A:ASP:O B:ASN:HD22 - A:ARG:O A:ARG:HD2 - B:THR:O A:ARG:HD3 - B:THR:O B:HIS:HE1 - A:ASP:OD1	2,470 1,970 2,229 2,390 2,305 2,206 1,847 2,330 2,940 2,580 3,049
1	-46,39	5	A:VAL:H - B:ASP:OD1 A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2 B:TRP:HE1 - A:PHE:O A:VAL:HA - B:ASP:OD1 B:TYR:HH - A:PHE	2,077 1,954 2,712 2,461 2,842
2	-50,78	3	A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE2 A:VAL:H - B:LEU:O B:GLN:HE21 - A:VAL:O	2,331 2,535 2,518
3	-31,23	2	B:ARG:HH12 - A:GLU:OE1 B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,548 2,064
4	-56,99	6	A:HID:H1 - B:GLU:OE2 A:PHE:H - B:PHE:O A:GLY:H - B:ASN:O B:PHE:H - A:ASN:OD1 A:ASN:HA - B:PHE:O B:GLU:HA - A:HID:O	2,298 2,274 2,261 2,403 2,734 2,588
5	-43,57	1	A:SER:HG - B:TYR:OH	2,602
6	-45,07	1	B:ASN:HD21 - A:LEU:OC2	3,041
7	-48,32	5	A:SER:H3 - B:ASP:OD2 A:SER:HG - B:ASP:OD1 A:TYR:H - B:PHE:O B:ARG:HH11 - A:TYR:OH A:SER:HB2 - B:ASP:OD1	2,265 2,805 2,405 3,001 2,342
8	-37,62	2	A:MET:H2 - B:ASP:OD2 A:LYS:H - B:GLN:OE1	2,491 2,513
9	-42,46	-	-	-
10	-48,87	2	A:ASN:HD22 - B:CYS:O A:LYS:HZ2 - B:CYS:O	2,981 2,662

11	-45,87	6	A:GLY:H3 - B:ASN:OD1 A:ASN:HD21 - B:THR:O B:ASN:HD22 - A:GLY:O B:THR:H - A:LEU:O B:THR:HA - A:ASN:OD1 B:THR:HB - A:ASN:OD1	1,872 2,988 2,406 3,012 2,375 2,928
12	-41,79	2	A:ASN:HD21 - B:GLY:O A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE2	2,772 2,831
13	-42,46	3	A:LYS:HZ1 - B:LEU:O A:LYS:HE1 - B:ASP:OD1 B:TRP:HD1 - A:THR:O	2,510 2,627 2,846
14	-39,12	3	A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2 B:ARG:HH22 - A:TYR:O A:LEU:H1 - B:PHE	3,015 1,936 3,184
15	-40,34	4	A:ASN:HD22 - B:CYS:SG B:ASN:HD22 - A:SER:O A:GLY:HA1 - B:GLN:OE1 B:GLY:HA3 - A:GLY:O	2,840 2,560 2,558 2,819
16	-50,80	3	B:PHE:H - A:ASP:OD1 B:ASN:HD21 - A:ASP:OD1 B:LYS:HA - A:ASP:OD1	2,474 2,578 2,551
17	-43,56	4	B:TYR:HH - A:ASP:OD1 B:GLN:HE21 - A:ASP:OD2 B:THR:HB - A:ASP:OD1 A:ARG:HH11 - B:PHE	3,027 2,156 2,485 3,069
18	-37,73	6	A:LYS:HZ1 - B:LEU:O A:LYS:HZ2 - B:LEU:O A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2 A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD2 B:TRP:HE1 - A:ASP:O B:ARG:HH22 - A:ASP:OD2	2,453 2,432 2,237 2,741 2,672 2,802
19	-52,31	9	A:HID:H - B:GLN:OE1 B:GLN:HE21 - A:GLU:OE1 B:GLN:HE22 - A:GLU:OE2 B:LEU:H - A:GLU:OE1 B:LYS:HZ1 - A:GLU:OE2 B:ARG:HH12 - A:PRO:O B:ARG:HH22 - A:PRO:O B:GLN:HA - A:GLU:OE1 B:LYS:HE2 - A:GLU:OE2	2,880 2,810 2,146 2,329 2,412 2,718 2,147 2,596 2,531
20	-58,93	10	A:ASP:H2 - B:VAL:O A:ALA:H - B:PHE:O A:ALA:H - B:LEU:O B:GLN:HE21 - A:GLU:OE2 B:LYS:HZ3 - A:GLU:OE1 B:PHE:H - A:ALA:O A:GLU:HA - B:LEU:O B:LYS:HA - A:ALA:O	2,898 2,704 2,799 2,480 2,129 2,278 2,474 2,712

			B:LYS:HE2 - A:GLU:OE2	2,492
			B:HIS:HE1 - A:THR:OG1	2,536
21	-47,42	1	A:ARG:HH11 - B:ARG:O	2,583
22	-46,53	5	A:ALA:H - B:GLU:OE2	2,932
			A:THR:H - B:GLN:OE1	2,969
			A:GLY:HA2 - B:GLN:OE1	2,734
			A:THR:HB - B:GLN:O	3,063
			B:GLY:HA3 - A:ARG:O	2,824
23	-41,87	4	A:LYS:HZ1 - B:TYR:OH	3,035
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE2	2,644
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE2	2,497
			A:LYS:HZ3 - B:TYR:OH	2,635
24	-40,02	2	A:ARG:HH11 - B:ASP:OD1	2,627
			B:GLN:HE22 - A:SER:O	2,596
25	-38,76	1	B:ARG:HH11 - A:ASP:OD1	2,392
26	-32,41	7	A:LEU:H1 - B:GLY:O	2,891
			A:LEU:H3 - B:GLY:O	3,093
			B:GLN:HE22 - A:ASN:O	1,997
			A:LYS:HA - B:GLN:OE1	2,692
			B:SER:HA - A:GLU:OE2	2,329
			B:SER:HB3 - A:GLU:OE2	2,729
			A:ASN:HD22 - B:TRP	2,950
27	-39,94	4	A:ASN:HD21 - B:LEU:O	2,982
			A:ASN:HD21 - B:CYS:O	2,266
			B:HIS:HD1 - A:GLU:OE1	2,194
			B:HIS:HE1 - A:GLU:OE1	2,880
28	-47,70	5	A:LYS:HZ1 - B:TYR:OH	2,458
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE2	1,964
			B:ARG:HH12 - A:GLU:O	2,510
			B:ARG:HH22 - A:GLU:O	2,921
			B:TRP:HE1 - A:ASN:OD1	2,754
29	-45,17	3	A:ASN:HD21 - B:GLU:OE2	3,070
			B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2	2,869
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,275
30	-42,05	4	B:GLY:H - A:ILE:OC1	2,616
			B:SER:H - A:ILE:OC1	2,560
			B:VAL:HA - A:SER:OG	2,439
			B:GLY:HA2 - A:ILE:OC1	2,560
31	-40,56	3	B:TRP:HE1 - A:ASN:OD1	1,878
			B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2	2,406
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,077
32	-40,64	4	A:ASN:HD21 - B:PHE:O	2,542
			B:CYS:H - A:GLU:OE2	2,542
			B:GLN:HE22 - A:LEU:O	2,165
			B:TRP:HE1 - A:SER:O	2,545
33	-49,24	1	B:HIS:HA - A:ARG:O	2,260
34	-47,13	4	A:ASN:HD22 - B:GLN:OE1	2,252
			B:THR:HG1 - A:SER:O	2,977

35	−43,49	9	A:ARG:HD2 - B:TYR:OH	2,734
			B:THR:HB - A:ASP:OD1	2,470
			B:GLN:HE22 - A:ASP:OD1	2,372
			B:LYS:HZ1 - A:ASP:OD1	1,924
			B:CYS:H - A:ILE:O	2,321
			A:ILE:HA - B:CYS:O	2,687
			A:LYS:HA - B:PHE:O	2,220
			A:LYS:HE1 - B:GLU:OE2	2,936
			B:LYS:HE2 - A:ASP:OD1	2,901
			B:LYS:HE2 - A:ASP:OD2	2,786
			B:GLU:HA - A:ILE:O	2,902
			B:GLN:HE22 - A:LYS:O	2,619
			B:TRP:H - A:ASN:OD1	2,360
			B:TRP:HE1 - A:ASN:O	2,739
36	−44,73	4	A:PRO:HD1 - B:GLN:OE1	2,657
			A:LYS:HZ3 - B:GLN:OE1	2,981
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2	2,174
37	−35,75	3	A:LYS:HE1 - B:TYR:OH	2,332
			B:TRP:HE1 - A:GLU:OE1	2,813
			B:TYR:HH - A:ASN:OD1	2,029
38	−41,24	3	A:LYS:HA - B:ASN:OD1	2,478
			B:TYR:HH - A:GLU:OE2	2,864
			B:TYR:HH - A:GLU:OE2	2,864
39	−34,08	1	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2	2,977
40	−50,96	5	A:LYS:HZ3 - B:ASN:OD1	2,621
41	−48,02	4	B:SER:HG - A:GLY:O	2,950
			A:LYS:HE2 - B:ASN:OD1	2,166
			A:SER:HB2 - B:TYR:OH	3,001
			A:ARG:HH12 - B:ASP:OD1	2,134
			A:ARG:HH22 - B:ASP:OD1	2,085
			B:GLN:HE22 - A:GLU:OE1	2,121
			B:ARG:HH22 - A:GLU:O	2,117
			A:LYS:HZ2 - B:GLN:OE1	2,697
			A:GLY:H - B:TRP:O	2,897
			B:ARG:HH22 - A:GLN:OE1	2,453
			B:GLN:HE22 - A:THR:OG1	2,849
			A:GLY:HA2 - B:TRP:O	2,636
			B:TYR:HA - A:TYR:OH	2,569
			A:GLY:H - B:PHE	3,263
42	−62,73	7	A:PHE:H - B:LEU:O	2,933
			A:MET:H - B:THR:O	2,903
			A:GLY:HA1 - B:THR:O	2,731
43	−54,16	4	B:THR:HB - A:MET:O	2,465
			A:THR:HG1 - B:TRP:O	2,867
			A:HID:HD1 - B:PHE:O	2,389
			A:HID:HD1 - B:TYR:OH	2,697
			B:GLN:HE22 - A:GLY:O	2,261
			B:TRP:HE1 - A:VAL:O	2,840
			A:THR:HB - B:TRP:O	2,800
44	−49,98	7		

45	-42,00	3	B:THR:HB - A:GLU:OE1 B:GLN:HE21 - A:VAL:O B:ARG:HH12 - A:TYR:OH B:LYS:HE2 - A:VAL:O B:THR:HB - A:LEU:OC2	2,827 2,087 1,906 2,395 2,660
46	-41,66	1		
47	-34,89	-	-	-
48	-16,91	2	A:LYS:HZ1 - B:THR:O A:LYS:HZ2 - B:THR:O	2,652 2,684
49	-46,91	3	A:HID:H2 - B:CYS:O A:HID:HE1 - B:PHE:O A:PHE:HA - B:TYR:OH	2,701 3,019 2,729
50	-42,32	7	A:SER:H2 - B:GLN:OE1 A:SER:HG - B:THR:OG1 A:LYS:HZ1 - B:GLU:O A:SER:HA - B:GLN:OE1 A:LYS:HE1 - B:GLU:O B:GLU:HA - A:THR:OC1 B:HIS:HE1 - A:PRO:O	2,661 2,991 2,998 2,942 2,843 2,973 2,380
51	-39,20	2	A:LEU:H - B:ASN:OD1 B:ASN:HD22 - A:LEU:O	2,659 1,777
52	-38,96	2	A:THR:HG1 - B:ASP:OD1 A:THR:HB - B:ASP:OD2	2,081 2,511
53	-44,49	2	A:LYS:HZ1 - B:GLY:O B:ASN:HD22 - A:TYR:OH	2,953 2,563
54	-41,60	3	A:LYS:HZ1 - B:PHE:O B:PHE:H - A:LEU:O B:LYS:HA - A:LEU:O	2,010 2,790 2,529
55	-44,52	3	A:TRP:H - B:GLN:OE1 A:ASN:HD22 - B:ASP:OD1 A:GLY:HA2 - B:GLU:OE1	2,624 2,090 2,523
56	-40,95	4	A:LEU:H - B:THR:O A:LYS:HZ3 - B:ARG:O B:THR:HA - A:LEU:O B:THR:HB - A:LEU:O	2,762 2,200 2,764 2,664
57	-42,50	5	A:ARG:HH11 - B:ASP:OD2 B:GLN:HE22 - A:LYS:O A:ASN:HA - B:GLN:OE1 A:ARG:HD2 - B:ASP:OD1 B:THR:HB - A:LEU:O	2,570 2,688 2,843 3,086 2,798
58	-42,66	2	A:ARG:HE - B:GLN:OE1 A:ARG:HH21 - B:GLN:OE1	2,555 2,392
59	-45,67	4	A:LYS:HZ2 - B:ASN:OD1 A:LYS:HZ1 - B:TYR:OH A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE2 A:ILE:HA - B:GLN:OE1	2,134 2,933 2,026 2,382
60	-38,68	1	A:LEU:H3 - B:ASP:O	2,760
61	-32,67	5	A:TYR:HH - B:ARG:O A:ASN:HD21 - B:ASP:O	2,845 2,588

			A:LYS:HZ1 - B:THR:OG1	2,588
			B:THR:HA - A:ASN:OD1	2,750
			B:HIS:HE1 - A:LYS:O	2,679
62	-44,02	6	A:THR:HG1 - B:CYS:O	2,760
			B:CYS:H - A:THR:OG1	2,903
			B:ASN:HD22 - A:ALA:O	2,765
			B:TYR:HH - A:THR:OC1	2,642
			A:GLY:HA1 - B:PHE:O	2,714
			A:GLY:HA1 - B:TYR:OH	2,793
63	-55,83	3	B:CYS:H - A:GLU:OE1	2,190
			B:HIS:HD1 - A:GLU:OE1	3,081
			B:ASN:HD22 - A:HID	3,251
64	-52,28	3	B:HIS:HD1 - A:GLU:OE2	2,448
			B:ARG:HH22 - A:ASP:OD1	2,727
			B:HIS:HE1 - A:GLU:OE2	3,042
65	-48,70	7	A:THR:H - B:CYS:O	2,754
			B:HIS:HD1 - A:ALA:O	2,903
			B:ASN:HD21 - A:GLU:OE1	2,865
			B:GLY:H - A:GLU:OE1	3,090
			B:GLY:H - A:GLU:OE2	2,043
			B:TRP:HE1 - A:HID:O	2,502
			A:GLY:HA1 - B:CYS:O	2,558
66	-52,29	7	A:ALA:H - B:CYS:O	2,907
			A:ALA:H - B:TYR:OH	2,380
			B:CYS:H - A:ALA:O	2,649
			B:HIS:HD1 - A:GLU:OE2	2,727
			B:GLY:H - A:GLY:O	2,530
			A:GLU:HA - B:CYS:O	2,770
			A:GLU:HA - B:PHE:O	2,687
67	-42,51	6	A:TYR:H3 - B:ASN:OD1	1,997
			A:TYR:HH - B:THR:O	2,686
			A:ASN:HD22 - B:GLN:O	2,651
			A:ASN:HD22 - B:THR:OG1	2,658
			A:ARG:HH22 - B:ASP:OD1	2,400
			A:SER:HG - B:PHE	3,219
68	-41,66	6	A:LYS:HZ1 - B:GLU:O	2,567
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:O	2,369
			A:SER:HG - B:ALA:O	2,409
			B:ARG:HE - A:THR:O	2,621
			B:ARG:HH21 - A:THR:O	3,014
			B:ALA:H - A:GLU:OE2	2,476
69	-42,91	4	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE1	2,866
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE1	2,922
			A:LYS:HE2 - B:GLU:OE1	2,403
			A:LEU:HA - B:GLN:OE1	2,533
70	-41,26	1	B:TRP:HE1 - A:GLU:OE1	1,802
71	-45,32	3	A:SER:HG - B:ASN:O	2,585
			A:SER:HB2 - B:ASN:O	2,997

72	-42,15	2	B:HIS:HA - A:SER:OG A:SER:HG - B:TYR:OH B:TRP:HE1 - A:TRP	2,650 2,076 3,041
73	-48,86	4	A:ARG:HH12 - B:GLU:OE2 A:ARG:HH12 - B:TYR:OH A:ARG:HH22 - B:TYR:OH A:LYS:HZ1 - B:GLN:OE1	2,720 2,779 1,978 2,915
74	-49,06	4	A:ARG:HH22 - B:CYS:O B:LEU:H - A:HID:NE2 A:ARG:HD1 - B:PHE:O B:GLN:HA - A:HID:NE2	2,453 2,096 2,692 2,674
75	-42,32	2	A:LYS:HE1 - B:GLU:OE2 A:LYS:HZ1 - B:TRP	2,095 2,218
76	-41,27	2	B:GLN:HE22 - A:ALA:O A:LYS:HA - B:TRP:O	2,654 2,381
77	-41,82	4	A:LYS:HZ1 - B:TYR:OH A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE2 A:LYS:HZ3 - B:TYR:OH B:TRP:HE1 - A:LYS:O	2,474 2,388 2,581 2,316
78	-50,89	4	A:LYS:HZ1 - B:GLY:O B:HIS:HD1 - A:GLU:OE2 B:LYS:HE2 - A:ASP:OD2 B:HIS:HE1 - A:GLU:OE1	2,289 2,723 2,216 2,927
79	-44,74	3	B:TRP:HE1 - A:ASN:OD1 B:THR:HG1 - A:PHE:O B:TRP:HD1 - A:ASN:OD1	2,990 2,779 2,884
80	-39,15	1	B:TYR:HH - A:GLU:O	2,835
81	-42,17	3	A:LYS:HZ3 - B:ASN:O B:HIS:HD1 - A:SER:OG B:GLN:HE22 - A:GLU:OE2	2,829 2,850 3,099
82	-40,88	5	B:GLN:HE21 - A:GLU:OE2 B:GLN:HE22 - A:GLU:OE2 B:ARG:HH12 - A:LYS:O B:LYS:HE2 - A:GLU:OE1	2,600 2,951 2,617 2,629
83	-41,64	4	B:GLY:HA3 - A:VAL:O B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE2 B:ASN:HA - A:GLU:OE1 B:GLY:HA3 - A:GLU:OE2	2,984 2,669 3,020 2,900
84	-42,17	2	B:CYS:H - A:PHE B:ASN:HA - A:GLU:OE1 B:GLY:HA3 - A:GLU:OE2	3,187 2,911 2,612
85	-43,92	5	B:CYS:H - A:SER:O B:HIS:HE2 - A:PHE:O A:LYS:HE2 - B:ASN:O A:SER:HA - B:CYS:O	1,864 2,755 2,109 2,586
86	-43,43	4	A:PHE:H1 - B:HIS A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD1 B:TRP:H - A:CYS:SG	2,964 2,419 2,756

87	-37,24	4	B:TRP:HE1 - A:ASP:OD1	2,590
			A:CYS:HA - B:PHE:O	2,826
			A:ASN:HD22 - B:LEU:O	2,907
			B:PHE:H - A:ILE:O	2,249
88	-37,73	2	A:ILE:HA - B:PHE:O	2,840
			B:LYS:HA - A:ILE:O	2,398
			B:TYR:HH - A:GLU:OE1	2,698
			A:LYS:HE1 - B:GLU:OE2	2,420
89	-51,31	2	A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE2	2,540
			B:ASN:HD21 - A:GLU:OE1	2,597
90	-38,54	2	A:LYS:HZ3 - B:LEU:O	2,881
			A:LYS:HE2 - B:LEU:O	2,630
91	-35,49	3	A:LYS:HZ2 - B:ASN:OD1	2,419
			B:GLN:HE22 - A:GLU:OE1	2,616
			B:TRP:HE1 - A:ASP:OD2	2,886

*Chain A adalah epitop dan chain B adalah reseptor.

Tabel IV.7 Hasil *docking* epitop dengan reseptor EphA3

Epitop	Grid Score (kkal/mol)	Jumlah Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrogen	Jarak (Å)
Senyawa 164	-43,10	3	*B:LYS:HZ1 - A:37W:O18	2,607
1	-54,11	7	B:MET:H - A:37W:O23	2,613
			B:LYS:HE3 - A:37W:O18	2,520
			A:ARG:HH22 - B:VAL:O	2,78
			A:LYS:H - B:ASP:OD2	2,639
2	-50,70	7	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE1	2,035
			B:ARG:HE - A:LYS:O	2,232
			B:ASN:HD22 - A:LYS:O	2,843
			B:GLY:HA2 - A:ASP:OD1	2,645
3	-33,67	3	B:PRO:HA - A:PRO:O	2,841
			B:ALA:H - A:ARG:O	2,541
			B:SER:HG - A:GLU:OC2	3,070
			B:ARG:HH21 - A:GLU:OE2	2,991
4	-42,39	8	B:TYR:HH - A:VAL:O	2,876
			B:LYS:HZ3 - A:PHE:O	2,018
			A:LYS:HA - B:GLU:OE1	2,591
			A:LYS:HA - B:GLU:OE2	2,692
			B:LYS:HZ2 - A:PHE:O	2,418
			B:LYS:HZ3 - A:PHE:O	2,501
			A:MET:HA - B:GLU:OE2	2,517
			A:GLY:H - B:ASP:OD2	2,666
			A:ALA:H - B:VAL:O	2,026
			B:LYS:HZ1 - A:ALA:O	2,445
			B:ARG:HE - A:GLU:OE1	2,648
			B:ARG:HH21 - A:GLU:OE1	2,621
			A:GLY:HA1 - B:ASP:OD2	2,621
			B:LYS:HE2 - A:TYR:OH	2,293
			B:SER:HB2 - A:GLY:O	2,411

5	-43,60	3	B:ASN:HD21 - A:HID:NE2	2,829
			B:ASN:HD21 - A:ASP:OD2	2,881
			B:ASN:HD21 - A:HID	3,149
6	-41,99	8	A:SER:H1 - B:ASN:OD1	2,454
			A:SER:H - B:GLU:O	2,096
			B:VAL:H - A:LEU:OC2	2,877
			B:LYS:HZ1 - A:SER:O	2,710
			B:LYS:HZ3 - A:SER:O	2,411
			A:SER:HA - B:GLU:O	2,155
			A:SER:HA - B:ASN:OD1	2,685
			A:SER:HB1 - B:GLU:O	2,779
7	-45,66	6	A:PHE:H - B:ARG:O	2,011
			A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2	2,243
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE2	2,678
			B:ASN:HD22 - A:SER:OC2	2,639
			A:SER:HA - B:ARG:O	3,035
			A:SER:HB1 - B:ASP:OD2	2,784
8	-28,32	2	A:GLY:HA1 - B:GLU:OE2	2,604
			A:PRO:HD2 - B:GLU:OE1	3,062
9	-50,01	5	A:LEU:H1 - B:ARG:O	2,504
			A:LEU:H3 - B:ARG:O	2,332
			A:SER:H - B:ASP:OD2	2,414
			A:LYS:HZ1 - B:GLY:O	3,007
			A:LEU:HA - B:ASP:OD2	3,008
10	-47,53	4	A:LYS:H3 - B:ARG:O	2,038
			B:LYS:HZ1 - A:LEU:O	3,092
			B:LYS:HE2 - A:LEU:O	2,996
			B:HIS:HE1 - A:ASN:OD1	2,472
11	-49,10	6	A:SER:HG - B:GLU:O	2,536
			B:SER:HG - A:ASN:OD1	2,420
			B:TYR:HH - A:THR:O	1,669
			A:SER:HA - B:GLU:O	2,583
			A:SER:HB2 - B:GLU:O	2,521
			A:LYS:HE1 - B:GLU:OE2	2,332
12	-54,63	5	A:TRP:HE1 - B:ASN:OD1	2,117
			A:TRP:HE1 - B:ASP:OD2	2,635
			B:ALA:H - A:LEU:O	1,972
			B:ARG:HH12 - A:LYS:O	2,440
			B:ARG:HH22 - A:LYS:O	2,124
13	-49,05	6	A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD1	2,343
			A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD2	1,598
			B:ARG:HH12 - A:ASP:OC2	2,646
			B:ARG:HH12 - A:LYS:O	2,953
			B:ARG:HH22 - A:LYS:O	2,827
			B:ARG:HD2 - A:ASP:OC1	2,735
14	-54,03	11	A:ASN:HD22 - B:ASP:OD2	2,450
			A:LYS:HZ3 - B:ARG:O	2,149
			B:SER:H - A:GLY:OC1	2,513

15	-51,37	6	B:ARG:HH21 - A:ASN:O	2,912
			B:LYS:HZ1 - A:LYS:O	2,808
			A:GLY:HA2 - B:SER:OG	2,611
			B:GLY:HA3 - A:TYR:O	2,859
			B:GLY:HA3 - A:GLY:OC1	2,712
			B:SER:HB2 - A:LYS:O	2,368
			B:LYS:HE2 - A:LYS:O	2,695
			B:LYS:HE3 - A:LYS:O	2,487
			A:THR:HG1 - B:ALA:O	2,235
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2	2,560
			A:LYS:HZ3 - B:ASN:OD1	2,264
			A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD2	2,425
			B:SER:HG - A:ASN:OD1	2,829
			B:ARG:HH22 - A:ASP:OD1	2,154
16	-44,43	8	A:ILE:H - B:VAL:O	1,895
			A:LYS:HZ3 - B:LYS:O	2,558
			B:LYS:HZ1 - A:ASP:OD1	1,940
			B:LYS:HZ1 - A:ASP:OD1	2,357
			A:HID:HD2 - B:ALA:O	2,705
			B:LYS:HE2 - A:ASP:OD1	2,675
			B:LYS:HE3 - A:ASP:OD2	3,040
			B:LYS:HA - A:GLN:OE1	2,757
			A:ARG:H3 - B:GLU:OE2	2,533
			B:ARG:HE - A:GLU:O	2,737
17	-45,19	5	B:ARG:HH21 - A:GLU:O	3,042
			B:ARG:HH12 - A:GLU:OE1	2,054
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	1,908
			A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD1	2,825
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2	2,400
			B:LYS:HZ1 - A:ASP:OD1	2,617
			B:LYS:HE2 - A:ASP:OD2	2,917
			A:VAL:H - B:VAL:O	1,756
18	-34,87	4	A:THR:HA - B:VAL:O	2,813
			B:GLY:HA3 - A:VAL:O	2,452
			B:ARG:HD3 - A:GLU:O	2,568
			B:SER:H - A:GLU:O	2,306
			B:SER:HG - A:GLU:OE2	2,831
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,896
19	-46,63	4	B:SER:HB2 - A:GLU:OE1	2,296
			B:SER:HB3 - A:GLU:OE2	2,247
			B:LYS:HE3 - A:GLU:OE1	2,805
			A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD2	2,688
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2	2,349
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD1	2,692
			A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD1	2,539
			B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2	2,643
			B:ARG:HH11 - A:GLU:OE1	2,702
			B:ARG:HD3 - A:ALA:O	2,874
20	-46,06	6		
21	-47,97	8		

22	-48,24	7	B:ARG:HD3 - A:ALA:O B:LYS:HZ1 - A:HID:NE2 B:SER:H - A:ALA:O B:ARG:HH21 - A:GLU:OE1 B:ARG:HH22 - A:GLU:OE1 B:SER:HB2 - A:ALA:O B:SER:HB3 - A:GLU:OE1 B:ARG:HD3 - A:GLU:OE2 A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD1 A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2 A:LYS:HZ3 - B:ASN:OD1 A:HID:HE1 - B:ALA:O B:PRO:HA - A:ALA:O A:SER:H3 - B:ASP:OD2 A:ILE:H - B:ASP:OD2 A:SER:HA - B:GLU:OE1 A:SER:HB1 - B:ASP:OD2 A:ARG:HH11 - B:GLU:OE1 A:ARG:HH21 - B:ASP:OD2 A:ARG:HH22 - B:ASP:OD1 A:ARG:HD1 - B:GLU:OE1 A:ARG:HD2 - B:GLU:OE1 B:ARG:HH21 - A:GLU:OE1 A:ASP:H2 - B:ALA:O B:ARG:HH12 - A:GLU:OE1 B:ARG:HH22 - A:ALA:O B:ASN:H - A:GLU:OE1 B:ASN:HD22 - A:ASN:OD1 B:GLN:HE22 - A:GLU:O B:GLN:HE22 - A:GLU:OC1 A:ASP:HA - B:ALA:O A:LYS:HE1 - B:ARG:O B:GLU:HA - A:GLU:OE2 B:ARG:HD3 - A:LYS:O B:LYS:HZ3 - A:GLU:OE2 B:ARG:HE - A:GLU:OE2 B:ARG:HH21 - A:GLU:OE2 B:ILE:H - A:GLU:O B:ARG:HH12 - A:GLU:OE1 B:PRO:HA - A:GLU:O A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE1 B:ARG:HH12 - A:GLU:OE1 B:ARG:HD2 - A:GLU:OE2 A:LYS:H2 - B:GLU:OE1 B:SER:HA - A:GLU:OE2 B:SER:HB2 - A:GLU:OE2 A:ASN:HD21 - B:ASP:OD2 B:GLN:HE22 - A:GLU:OE1	2,327 2,422 3,031 2,666 2,999 2,542 2,494 2,901 2,477 2,296 2,001 2,628 2,763 1,824 1,799 2,739 2,951 2,771 3,097 1,907 2,715 2,966 2,772 2,898 2,568 2,675 2,557 2,312 2,240 2,972 2,755 2,552 2,618 2,127 2,519 2,916 2,908 2,615 3,047 2,809 2,603 2,776 2,813 2,916 2,612 2,826 3,009 1,886
23	-43,46	5		
24	-47,67	4		
25	-42,74	5		
26	-41,21	1		
27	-40,52	11		
28	-47,65	6		
29	-43,60	3		
30	-55,52	3		
31	-47,36	3		

32	-42,79	8	B:ARG:HD3 - A:GLU:OE2 B:LYS:HZ1 - A:GLU:OE1 B:LYS:HZ3 - A:GLU:OE1 B:LYS:HZ1 - A:GLU:OE1 B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE2 B:HIS:HE2 - A:GLU:OE1 B:GLY:HA2 - A:ASN:OD1 B:GLY:HA3 - A:GLU:OE2 B:HIS:HE1 - A:GLU:OE1	2,730 2,416 2,798 2,759 2,872 2,327 2,543 2,360 3,099
33	-44,77	4	A:ARG:HH11 - B:GLU:OE1 B:ARG:HE - A:ARG:O A:ARG:HD1 - B:ASP:OD1 B:GLY:HA2 - A:ASP:OD2	1,996 2,968 2,303 2,450
34	-48,99	4	A:ARG:HH11 - B:GLU:OE1 A:ARG:HH12 - B:GLU:OE2 B:ARG:HE - A:ARG:O A:ARG:HD1 - B:ASP:OD1	2,203 2,775 2,461 2,932
35	-44,22	9	A:ALA:H1 - B:ASP:OD1 A:ALA:H2 - B:ASP:OD2 A:LEU:H - B:ALA:O B:ARG:HH12 - A:ASP:O B:ASN:HD22 - A:TYR:OC2 A:GLY:HA1 - B:ALA:O A:GLY:HA2 - B:ALA:O A:PRO:HD2 - B:ALA:O B:ARG:HD2 - A:TYR:OC1	2,375 1,921 2,031 2,333 2,440 2,977 3,070 2,922 2,759
36	-42,68	9	A:ALA:H2 - B:GLU:OE1 A:CYS:H - B:GLU:OE2 A:ILE:H - B:GLU:OE2 A:SER:HG - B:GLU:O B:ARG:HH21 - A:ASP:OD1 B:LYS:HZ1 - A:TYR:O A:SER:HB1 - B:GLU:O B:LYS:HE2 - A:SER:O B:LYS:HE3 - A:SER:O	1,927 2,713 2,842 2,591 2,251 2,566 2,470 2,773 2,479
37	-40,97	3	B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2 B:ARG:HD2 - A:ASP:OD2 B:ARG:HD3 - A:ASP:OD2	2,187 2,750 2,470
38	-43,85	5	A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE1 A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE1 B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE2 B:LYS:HZ1 - A:ASN:OD1 B:LYS:HZ2 - A:ASN:OD1	2,701 2,983 2,795 2,861 2,838
39	-31,12	2	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2 A:LYS:HZ1 - B:VAL:O	2,000 2,226
40	-42,89	2	B:LYS:HZ1 - A:SER:O B:SER:HB2 - A:GLU:OE2	2,875 2,494
41	-6,95	-	-	-

42	-42,88	7	A:LYS:HZ3 - B:TYR:OH	2,453
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:O	2,658
			B:LYS:HZ3 - A:GLY:O	2,528
			B:LYS:HZ1 - A:VAL:O	2,734
			B:LYS:HZ3 - A:VAL:O	2,413
			A:LYS:HE2 - B:GLU:O	2,423
			B:GLU:HA - A:ALA:O	2,719
43	-50,49	4	B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2	2,121
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,189
			B:LYS:HE2 - A:THR:O	2,440
			B:ARG:HD3 - A:HID:NE2	2,558
44	-38,64	5	A:ASN:HD21 - B:ASP:OD2	2,571
			A:ASN:HD22 - B:ASP:OD2	2,507
			B:GLU:H - A:MET:O	2,749
			A:GLY:HA1 - B:ALA:O	2,963
			B:SER:HB2 - A:VAL:O	2,767
45	-31,13	-	-	-
46	-50,26	5	B:ARG:HH22 - A:GLY:O	2,717
			A:PRO:HD2 - B:SER:OG	2,951
			A:LEU:HA - B:VAL:O	2,709
			B:GLY:HA3 - A:PRO:O	2,636
			B:SER:HB3 - A:GLY:O	2,430
47	-26,08	1	B:GLU:HA - A:LEU:O	2,746
48	-4,60	1	A:SER:HB1 - B:GLU:OE2	2,897
49	-29,95	1	B:LYS:HE2 - A:TYR:O	2,701
50	-37,56	2	A:TYR:HH - B:GLU:O	2,791
			A:SER:HB1 - B:GLU:OE2	2,957
51	-36,96	6	A:LEU:H - B:ALA:O	2,778
			A:LEU:H - B:VAL:O	2,343
			A:ASN:HD21 - B:ASN:OD1	2,754
			A:TYR:HA - B:VAL:O	2,929
			B:GLY:HA3 - A:LEU:O	2,057
			B:LYS:HE2 - A:SER:OG	2,328
52	-35,13	1	B:ARG:HH12 - A:LEU:O	2,981
53	-40,50	6	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2	3,100
			A:THR:HG1 - B:GLU:O	3,085
			A:ASN:HD21 - B:ALA:O	1,987
			A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD2	2,640
			A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD2	3,063
			B:ARG:HD3 - A:LYS:OC2	2,766
54	-55,56	11	A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE1	2,949
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:OE1	2,912
			A:LYS:HZ1 - B:MET:O	2,797
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:O	2,503
			A:LYS:HZ3 - B:MET:O	2,709
			A:LYS:HZ3 - B:GLU:O	2,678
			B:LYS:HZ3 - A:ASP:OD1	2,625
			A:SER:HA - B:VAL:O	3,061

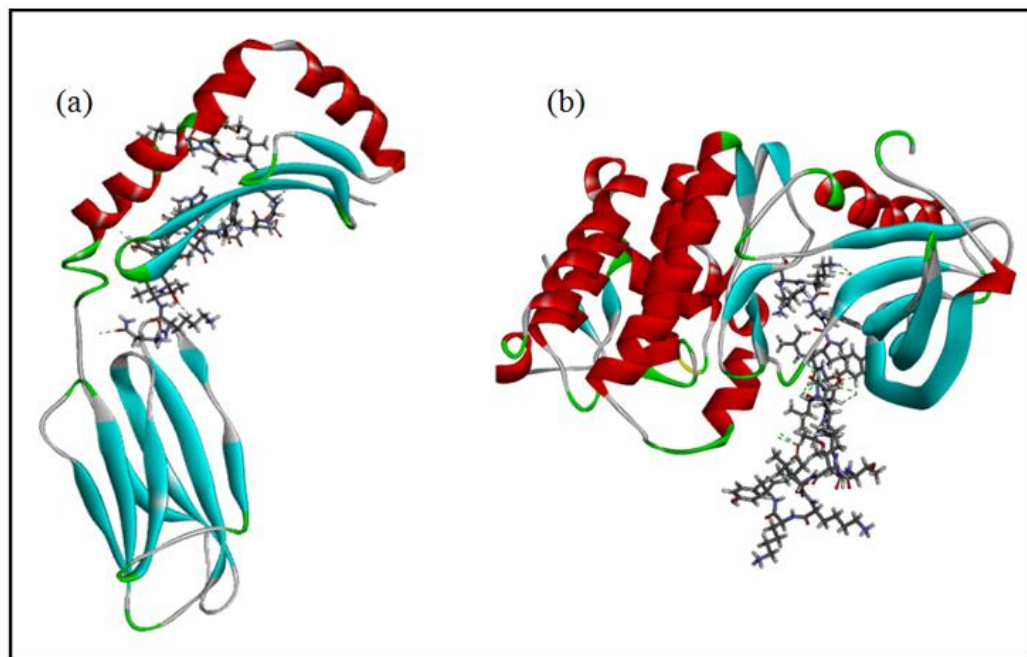
55	-50,24	4	A:SER:HB2 - B:VAL:O	2,201
			B:GLY:HA3 - A:SER:OG	2,508
			B:LYS:HE2 - A:ASP:OD1	2,949
			B:SER:HG - A:GLY:OC2	2,860
			B:LYS:HZ3 - A:THR:OG1	2,579
56	-49,05	4	B:LYS:HE2 - A:TYR:O	2,704
			B:LYS:HE3 - A:GLY:OC2	3,061
			A:LYS:H3 - B:ASP:OD1	3,062
			B:ALA:H - A:TYR:OH	1,798
			B:LYS:HE3 - A:ARG:OC2	1,978
57	-52,83	3	B:VAL:HA - A:LYS:O	2,767
			A:LYS:HZ3 - B:SER:O	2,553
			A:LYS:HA - B:ARG:O	2,806
58	-47,88	8	B:ARG:HD3 - A:THR:OG1	2,968
			A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD2	2,081
			A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2	2,369
			A:THR:HG1 - B:ASP:OD2	2,741
			A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE1	2,683
			A:LYS:HZ1 - B:GLU:OE2	2,666
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE1	2,824
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE2	3,074
			B:SER:H - A:SER:OG	2,804
			A:LEU:H - B:GLU:OE2	2,816
59	-33,48	3	B:LYS:HZ2 - A:TYR:OH	2,641
			A:PRO:HA - B:GLU:OE2	2,270
60	-37,44	1	A:LYS:HE2 - B:ARG:O	2,739
61	-38,44	4	A:TYR:HH - B:GLU:O	2,343
			A:ARG:HH22 - B:GLU:OE2	2,564
			B:LYS:HZ2 - A:ASP:OD2	2,242
62	-43,70	5	B:LYS:HE2 - A:ASP:OD1	2,214
			A:VAL:H1 - B:ALA:O	2,748
			A:VAL:H3 - B:ALA:O	3,000
			B:ALA:H - A:GLU:OE1	2,290
			A:VAL:HA - B:ALA:O	3,049
63	-41,95	6	B:ARG:HD3 - A:THR:O	2,484
			A:THR:H - B:ASP:OD2	2,980
			B:ARG:HE - A:ALA:O	2,873
			B:ARG:HH11 - A:ALA:O	2,611
			B:ARG:HH12 - A:ALA:O	3,075
			B:ARG:HH21 - A:ALA:O	3,050
			A:GLY:HA2 - B:ASP:OD2	2,460
			B:ARG:HH21 - A:HID:NE2	2,630
64	-42,06	4	B:ARG:HE - A:HID:OC1	2,900
			B:ARG:HH22 - A:HID:OC1	3,032
			B:LYS:HE2 - A:GLU:OE2	2,896
65	-50,95	8	A:CYS:H3 - B:ASP:O	2,235
			A:GLU:H - B:VAL:O	2,517
			A:ARG:HH12 - B:GLY:O	2,383

			B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE2	2,766
			B:LYS:HZ3 - A:GLU:O	2,787
			A:ALA:HA - B:VAL:O	2,732
			A:ARG:HD2 - B:GLU:OE1	2,870
			B:GLY:HA2 - A:GLU:O	3,055
66	-32,76	4	A:THR:HG1 - B:ALA:O	2,315
			B:LYS:HZ1 - A:GLU:OE2	2,535
			B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE1	1,935
			B:ARG:HH21 - A:HID:NE2	2,450
67	-34,22	1	B:ARG:HD3 - A:GLN:O	2,564
68	-30,15	-	-	-
69	-44,47	3	A:TRP:HE1 - B:VAL:O	2,325
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE1	1,914
			A:TRP:HD1 - B:VAL:O	2,834
70	-32,71	5	A:GLN:HE22 - B:GLU:OE2	2,509
			A:SER:HG - B:GLU:OE2	2,699
			A:ASN:HD22 - B:GLU:O	1,868
			B:LYS:HZ1 - A:ASN:O	2,611
			B:LYS:HE2 - A:ASN:O	3,001
71	-39,76	2	B:ARG:HH11 - A:GLU:OE1	3,052
			B:ARG:HH21 - A:GLU:OE2	2,441
72	-45,31	5	B:ILE:H - A:ALA:OC2	2,637
			B:ARG:HH12 - A:LEU:O	2,869
			B:ARG:HH22 - A:LEU:O	3,033
			B:ASN:HD22 - A:ARG:O	2,726
			B:ASN:HD22 - A:ALA:OC2	2,528
73	-40,34	5	A:SER:HG - B:ARG:O	2,810
			A:ARG:HH12 - B:VAL:O	2,276
			A:ARG:HH22 - B:VAL:O	1,926
			A:THR:HA - B:GLU:OE1	2,602
			A:ALA:HA - B:ALA:O	2,540
74	-42,23	2	B:ARG:HH11 - A:GLU:OE1	3,052
			B:ARG:HH21 - A:GLU:OE2	2,441
75	-35,82	3	A:ARG:HH21 - B:GLU:OE1	2,822
			A:ARG:HH22 - B:GLU:OE1	2,688
			B:PRO:HD3 - A:ASN:OD1	2,568
76	-34,15	3	A:PHE:H - B:GLU:OE2	2,550
			A:LYS:HZ2 - B:GLU:OE1	1,985
			A:ILE:HA - B:GLU:OE2	2,092
77	-39,59	6	A:ARG:HH11 - B:VAL:O	2,938
			A:LYS:HZ1 - B:GLY:O	2,200
			B:ARG:HE - A:ALA:OC1	2,092
			B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,355
			B:ARG:HD2 - A:GLU:O	2,830
			B:ARG:HD3 - A:LEU:O	2,849
78	-36,57	4	A:TRP:HE1 - B:ALA:O	2,125
			B:LYS:HZ2 - A:GLU:OE2	2,165
			B:LYS:HZ1 - A:ALA:O	2,362

79	-48,04	3	B:GLY:HA3 - A:PHE:OC2 A:LYS:HZ1 - B:ASN:OD1 A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD1 A:LYS:HE1 - B:ASP:OD2 B:PRO:HA - A:GLU:OE1 A:LYS:HZ3 - B:MET:O B:LYS:HZ2 - A:ASN:OD1 B:SER:HG - A:GLU:OE2 B:ARG:HE - A:SER:OC1 B:ARG:HH21 - A:SER:OC1 B:ARG:HH12 - A:SER:OG A:ASN:HD21 - B:ASP:OD1 A:ASN:HD22 - B:ASP:OD2 A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2 A:LYS:HZ3 - B:ASN:OD1 B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2 B:ARG:HH11 - A:GLU:OE1 A:LYS:HE2 - B:ASN:OD1 A:LYS:HE2 - B:ASP:OD2 B:SER:HG - A:ASN:OD1 B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2 B:LYS:HA - A:ASP:OD2 B:LYS:HE2 - A:ASN:O B:LYS:HZ1 - A:GLU:OE1 A:ALA:HA - B:VAL:O B:LYS:HE2 - A:SER:OG B:GLY:HA3 - A:GLU:OE2 B:ARG:HD3 - A:ASP:OD1 A:PHE:H1 - B:VAL:O B:ALA:H - A:MET:O B:ARG:HH12 - A:ILE:O A:LYS:HE1 - B:GLY:O B:ARG:HH21 - A:ALA:O B:LYS:HZ3 - A:ASN:OD1 B:ARG:HH12 - A:ASP:OD2 B:LYS:HE2 - A:ASN:OD1 B:ARG:HD2 - A:ASP:OD1 A:THR:H2 - B:ASP:OD2 B:ARG:HH11 - A:ASP:OD1 A:LYS:HE1 - B:GLU:OE2 A:ASN:HD21 - B:ALA:O A:LYS:HZ2 - B:ASP:OD2 B:ARG:HE - A:ASN:OD1 A:LYS:HE1 - B:ASP:OD2 B:ARG:HD3 - A:ASN:OD1 A:LYS:HZ1 - B:ASP:OD2 A:LYS:HZ3 - B:ASP:OD2 B:ARG:HH12 - A:GLU:OE2	2,713 1,961 2,548 2,545 2,138 2,749 2,458 2,921 2,900 3,049 2,280 2,453 2,578 2,154 2,374 2,121 2,219 2,794 2,839 2,879 2,935 2,762 2,765 2,874 2,674 2,281 2,615 2,713 2,026 2,603 1,635 2,016 2,370 3,037 1,857 2,393 2,295 3,002 2,633 2,662 2,891 3,096 2,872 2,822 2,745 3,073 2,852 1,908
80	-36,29	1		
81	-39,78	6		
82	-45,47	8		
83	-46,73	4		
84	-43,64	5		
85	-43,49	4		
86	-46,97	5		
87	-33,65	3		
88	-44,85	5		
89	-45,65	5		

90	-28,76	2	B:ARG:HH22 - A:GLU:OE2	2,260
			B:ARG:HD3 - A:GLU:OE1	2,878
			B:LYS:HE2 - A:GLU:O	2,720
			B:LYS:HZ1 - A:PHE	2,803
91	-36,68	6	A:LYS:HZ1 - B:GLY:O	2,354
			A:ASN:HD21 - B:ALA:O	2,489
			A:LYS:HZ1 - B:SER:OG	2,431
			A:LYS:HZ1 - B:SER:OG	2,287
			B:ALA:H - A:ASN:OD1	2,357
			B:GLY:HA2 - A:ASN:OD1	2,942

*Chain A adalah epitop dan chain B adalah reseptor.

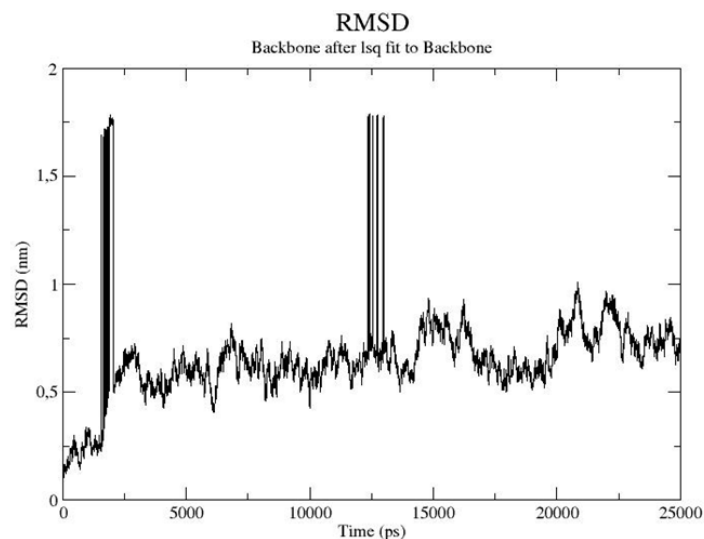


Gambar IV.10 Visualisasi hasil docking. (a) Epitop 42 terhadap MHC II HLA DRB1 0101; (b) Epitop 54 terhadap reseptor EphA3. Ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus berwarna hijau.

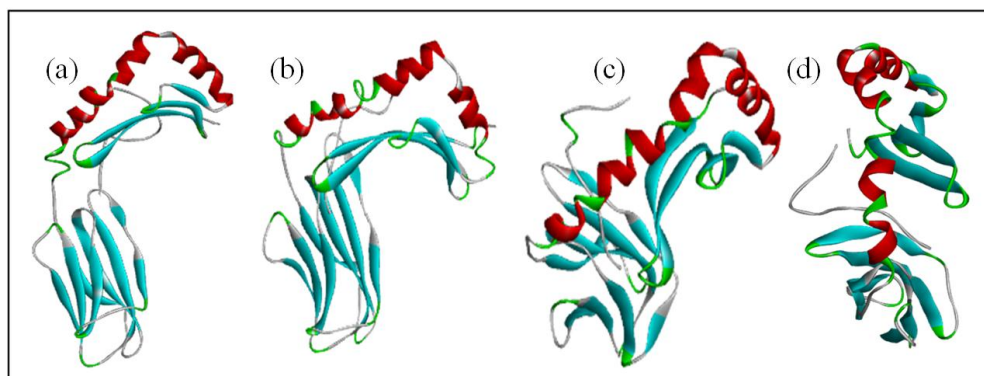
IV.9 Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan pada kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 dan epitop 54-reseptor EphA3. Pada simulasi dinamika molekuler, epitop dan reseptor berada dalam keadaan fleksibel. Simulasi ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan kompleks epitop dengan reseptor hasil *docking*. Simulasi dinamika molekuler dilakukan selama 25 ns.

Kestabilan dari kompleks epitop-reseptor dapat dilihat dari perubahan konformasi struktur selama simulasi dinamika molekuler. Hal tersebut dapat dilihat dari fungsi RMSD terhadap waktu simulasi. Hasil simulasi kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 menghasilkan RMSD yang meningkat drastis pada awal simulasi, yaitu 17 Å pada waktu 1,67 ns. Namun setelah 1,72 ns fluktuasi RMSD dari kompleks mulai relatif stabil hingga 12,34 ns antara 4-8 Å. Setelah itu kompleks mulai tidak stabil hingga akhir simulasi (Gambar IV.11). Pada Gambar 1V.12 dapat dilihat perubahan konformasi kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 selama simulasi.

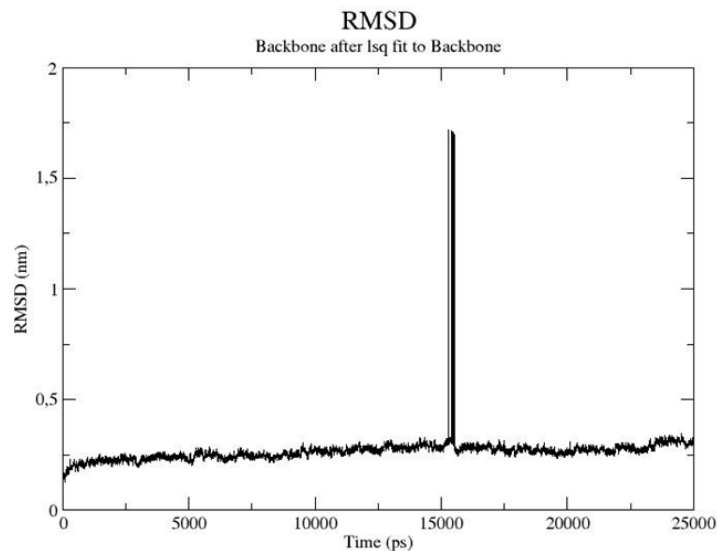


Gambar IV.11 Grafik perubahan RMSD terhadap waktu selama simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101.

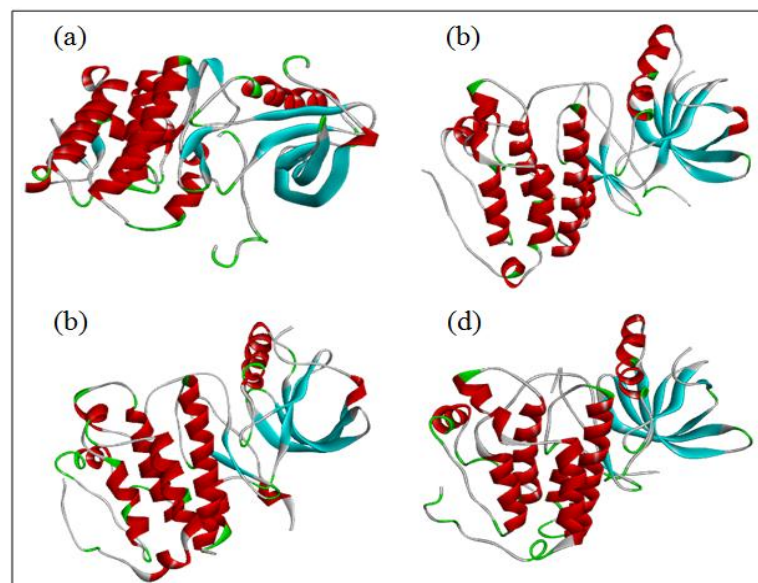


Gambar IV.12 Perubahan konformasi kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 selama simulasi dinamika molekuler. (a) Waktu 0 ns; (b) Waktu 10 ns; (c) Waktu 15 ns; (d) Waktu 25 ns.

Pada simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 54-reseptor EphA3, fluktuasi RMSD stabil hingga 15,29 ns. Kemudian RMSD meningkat drastis hingga 17 Å dan kembali stabil saat 15,48 ns. Fluktuasi RMSD kondisi stabil kompleks epitop 54-reseptor EphA3 sekitar 1,7-3,4 Å (Gambar IV.13). Pada hasil simulasi 15 ns, bentuk 3D dari epitop 54 berubah dari *coil* menjadi β -sheet pada 7 asam amino terakhir, yaitu Asn, Thr, Ile, Leu, Lys, Tyr dan Asp (Gambar IV.14).

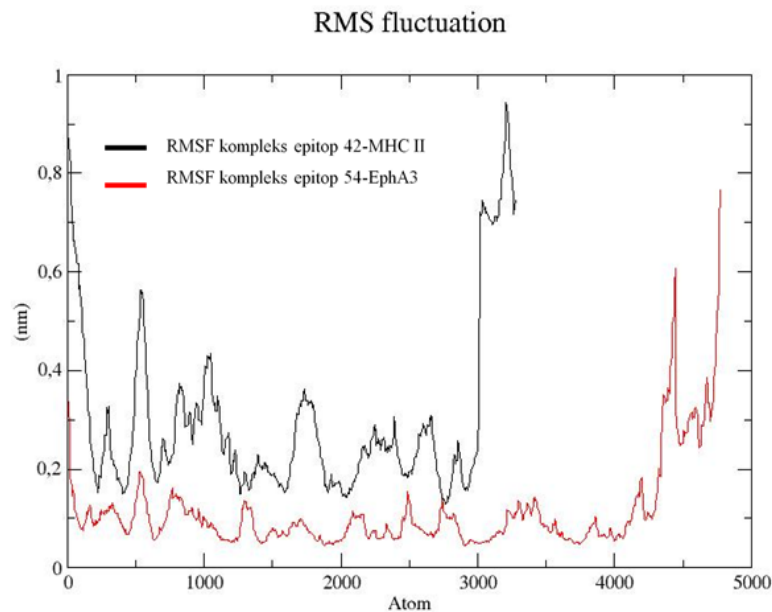


Gambar IV.13 Grafik perubahan RMSD terhadap waktu selama simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 54-reseptor EphA3.



Gambar IV.14 Perubahan konformasi kompleks epitop 54-reseptor EphA3 selama simulasi dinamika molekuler. (a) Waktu 0 ns; (b) Waktu 10 ns; (c) Waktu 15 ns; (d) Waktu 25 ns.

Pergerakan atom dalam simulasi dinamika molekuler kompleks dapat dilihat dari nilai RMSF selama simulasi (Gambar IV.15). Dari grafik RMSF, diketahui bahwa atom epitop yang lebih banyak berfluktuasi dibandingkan dengan reseptor. Atom epitop 42 dimulai dari urutan atom ke-3013 dari kompleks. Sementara, atom epitop 54 dimulai dari urutan atom ke-4450 dari kompleks.



Gambar IV.15 Grafik RMSF simulasi dinamika molekuler kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 dan kompleks epitop 54-reseptor EphA3 selama 25 ns.

BAB V Penutup

V.1 Simpulan

Dari hasil *homology modeling* 91 epitop IDH1 (R132H) didapatkan 2 kandidat vaksin glioma terbaik hasil skrining virtual dengan studi *docking*, yaitu epitop 42 yang memiliki potensi preventif dan epitop 54 yang memiliki potensi kuratif. Pada simulasi dinamika molekuler, kompleks epitop 42-MHC II HLA DRB1 0101 relatif stabil pada 1,72-12,34 ns, dan kompleks epitop 54-reseptor EphA3 stabil dari awal simulasi hingga 15,29 ns.

V.2 Saran

Perlu dilakukan sintesis epitop 42 dan epitop 54 serta pengujian eksperimental lebih lanjut secara *in vitro* dengan *cell line* Hs 683 dan *in vivo* untuk membuktikan bahwa epitop-epitop dari IDH1 (R132H) tersebut memiliki aktivitas preventif dan kuratif terhadap glioma.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, M., Hess, B., Spoel, D., dan Lindahl, E. (2015): GROMACS user manual version 5.0.6., the Royal Institute of Technology and Uppsala University, Sweden, 1-196.
- Amelia, T. (2015): Tesis: *Homology modeling* dan studi *in silico* listeriolysin o sebagai kandidat vaksin kanker paru NSCLC, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1-59.
- Andreatta, M., Schafer-Nielsen, C., Lund, O., Buus, S., dan Nielsen, M. (2011): NNAlign: A web-based prediction method allowing non-expert end-user discovery of sequence motifs in quantitative peptide data, *PLoS ONE*, 61-11.
- Anonim. (2009): Brain Tumors, *National Cancer Institute*, 1-47.
- Archer, G. E., Reap, E., Norberg, P., Cui, X., Schmittling, R., Herndon, J., Chandramohan, V., Riccione, K., Kuan, C., Yan, H., Bigner, D. D., dan Sampson, J. H. (2014): IDH1 mutations as a immunotherapeutic target for brain tumors, *Neuro-Oncology*, **16**, 23-41.
- Arita, H., Narita, Y., Yoshida, A., Hashimoto, N., Yoshimine, T., dan Ichimura K. (2015): IDH1/2 mutation detection in gliomas, *Brain Tumor Pathol*, **32**, 79-89.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., dan Deimling, A. (2008): Analysis of the IDH1codon 132 mutation in brain tumors, *Acta Neuropathol*, 116, 597-602.
- Baratawidjaja, K. G. dan Rengganis, I. (2014): Immunologi dasar edisi XI, *Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*, Jakarta, 401-527.
- Benkert, P., Biasini, M., dan Schwede, T. (2011): Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, **Original Paper**, **27**, 343–350.
- Benkert, P., Kunzli, M., dan 1,2 and Schwede, T. (2009): QMEAN server for protein model quality estimation, *Nucleic Acids Research*, **37**, 510-514.
- Benkert, P., Schwede, T., dan Tosatto, S. C. 2. (2009): QMEANclust: Estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information, *BMC Structural Biology*, **9**, 35-51.
- Berardinis, P. D., Guardiola, J., dan Manca, F. (1997): Epitope context and reshaping of activated T helper cell repertoire, *Human Immunology*, **54**, 189-193.
- Bleeker, F. E., Atai, N. A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K. S. Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W. P., Bardelli, A., dan Noorden C. J. F. V. (2010): The prognostic IDH1R132 mutation is associated with reduced NADP⁺-dependent IDH activity in glioblastoma, *Acta Neuropathol*, **119**, 487-494.
- Chen, C., Hwang, J., dan Yang, J. (2006): (PS)2: Protein structure prediction server, *Nucleic Acids Research*, **34**, 152-157.
- Chen, C., Hwang, J., dan Yang, J. (2009): (PS)2-v2: Template-based protein structure prediction server, *BMC Bioinformatics*, **10**, 366-378.
- Chen, V. B., W. Arendall, B., Headd, J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral, G. J., Murray L. W., Richardson, J. S., dan Richardson, D. C.

- (2010): MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallographica*, **66**, 12-21.
- Cherryholmes, G. A., Stanton, S. E., dan Disis, M. L. (2015): Current methods of epitope identification for cancer vaccine design, *Vaccine*, 1-7.
- Ciccotti, G., Ferrario, M., dan Schuette, C. (2014): Molecular Dynamics Simulation, *MDPI*, Switzerland.
- Cliftona, G. T., Kohrtb, H. E., dan Peoplesc, G. E. (2015): Critical issues in cancer vaccine trial design, *Vaccine*, 1-7.
- Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S., dan Richardson, D. C. (2004): MOLPROBITY: Structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes, *Nucleic Acids Research*, **32**, 615-619.
- Day, B. W., Stringer, B. W., Al-Ejeh, F., Ting, M. J., Wilson, J., Kathleen E. S., Jamieson, P. R., Bruce, Z. C., Lim, Y. C., Offenhauser, C., Charmsaz, S., Cooper, L. T., Ellacott, J. K., Harding, A., Leveque, L., Inglis, P., Allan, S., Walker, D. G., Lackmann, M., Osborne, G., Khanna, K. K., Reynolds, B. A., Lickliter, J. D., dan Boyd, A. W. (2013): EphA3 maintains tumorigenicity and is a therapeutic target in glioblastoma multiforme, *Cancer Cell*, **23**, 238-248.
- Dimitrov, L., Hong C. S., Yang, C., Zhuang, Z., dan Heiss, J. D. (2015): New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma, *International Journal of Medical Sciences*, **12**, 201-213.
- Dong, J., Zhao, H., Zhou, T., Spiliotopoulos, D., Rajendran, C., Li, X., Huang, D., dan Caflisch, A. (2015): Structural analysis of the binding of type I, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **6**, 79-83.
- Doytchinova, I. A. dan Flower, D. R. (2007): VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines, *BMC Bioinformatics*, **8**, 4-10.
- Fan, H. dan Mark, A. E. (2004): Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques, *Protein Science*, **13**, 211-220.
- Fiser, A., Do, R. K., Sali, A. (2000): Modeling of loops in protein structures, *Protein Science*, **9**, 1753-1773.
- Fooladi, A. A. I., Hosseini, H. M., dan Amani, J. (2015): An *in silico* chimeric vaccine targeting breast cancer containing inherent adjuvant, *Iran J Cancer Prevent*, **8**, 1- 8.
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., dan Nussinov R. (2002): Principle of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions, *Proteins*, **47**, 409-443.
- He, L. dan Zhu, J. (2015): Computational tools for epitope vaccine design and evaluation, *Current Opinion in Virology*, **11**, 103-112.
- He, Y. dan Xiang, Z. (2013): Databases and in silico tools for vaccine design. *Methods Mol Biol*, **993**, 115-142.
- Heo, L., Par, H., dan Seok, C. (2013): GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking, *Nucleic Acids Research*, **41**, 384-388.
- Holling, T. M., Schooten, E., dan Elsen, P. J. D. (2004): Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men, *Human Immunology*, **65**, 282-290.

- Humphrey, W., Dalke, A., dan Schulten, K. (1996): VMD: Visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 33-38.
- Janes, P. W., Slape, C. I., Farnsworth, R. H., Atapattu, L., Scot, A. M., dan Vail, M. E. (2014): EphA3 biology and cancer, *Growth Factors*, **32**, 176–189.
- John, B. and Sali, A. (2003): Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment, *Nucleic Acids Research*, **31**, 3982-3992.
- Jones, D. T. (2007) Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information, *Original Paper*, **23**, 538-544.
- Kall, L., Krogh, A., dan Sonnhammer, E. L. L. J. (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method, *JMB*, **338**, 1027-1036.
- Kandasamy, S., Hassan, S., Gopalaswamy, R., dan Narayanana, S. (2014): Homology modelling, docking, pharmacophore and site directed mutagenesis analysis to identify the critical amino acid residue of PknI from Mycobacterium tuberculosis, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **52**, 11-19.
- Kaufman, H. L. dan an Wolchok, J. D. (Ed.). (2007): General principles of tumor immunotherapy, *Springer*, New York, 171-317.
- Kaushik, S., Mohanty, D., dan Surolia, A. (2011): Role of glycosylation in structure and stability of Erythrina corallodendron lectin (EcorL): A molecular dynamics study, *Protein Science*, **20**, 465-481.
- Kiszka, E. (2011): Master's thesis: A pre-docking filter based on image recognition, *Saarland University Center for Bioinformatics*, Saarbrücken, 1-60.
- Ko, J., Park, H., Heo, L., dan Seok C. (2012): GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement, *Nucleic Acids Research*, **40**, 294-297.
- Ko, J., Park, H., dan Seok, C. (2012): GalaxyTBM: Template-based modeling by building a reliable core and refining unreliable local regions, *BMC Bioinformatics*, **13**, 198-205.
- Komite Nasional Penanggulangan Kanker. (2015): Panduan nasional penanganan tumor otak, *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*, Jakarta, 1-5.
- Kovjazina, R., Volovitz, I., Kundelc, Y., Rosenbaumc, E., Medaliac, G., Horne, G., Smorodinskye, N. I., Brenner, B., dan Carmon, L. (2011): ImMucin: A novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors, *Vaccine*, **29**, 4676-4686.
- Krieger, E., Nabuurs, S. B., dan Vriend, G. (2003): Homology modeling, *Wiley-Liss Inc.*, 507-521.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne G., dan Sonhammer, E.L.L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes, *J.Mol.Biol.* **305**, 567-580.
- Labussiere, M., Sanson, M., Idbaih, A., dan Delattre, J. Y. (2010): IDH1 gene mutations: A new paradigm in glioma, prognosis and therapy?, *The Oncologist*, **15**, 196-199.
- Larsen, M. V., Lundegaard, C., Lamberth, K., Buus, S., Lund, O., dan Nielsen, M. (2007): Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction, *BMC Bioinformatics*, **8**, 424-435.

- Lee, G. R., Heo, L., dan Seok, C. (2015): Effective protein model structure refinement by loop modeling and overall relaxation, *Proteins*, 1-9.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., dan Shaw, D. E. (2010): Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, *Proteins*, **78**, 1950–1958.
- Lollini, P., Cavallo, F., Nanni, P., dan Forni, G. (2006): Vaccines for tumour prevention, *Nature*, **6**, 204-216.
- Lo-Man, R. dan Leclerc C. (1997): Parameters affecting the immunogenicity of recombinant T cell epitopes inserted into hybrid proteins, *Human Immunology*, **54**, 180-188.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., dan Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol*, **114**, 97-109.
- Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., dan Sali, A. (2000): Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291-325.
- McPherson, C. (2016): Glioma brain tumors, *Mayfield Clinic*, 1-3.
- Meller, J. , (2001): Molecular dynamics, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8.
- Melo, F., Sanchez, R., dan Sali, A. (2002): Statistical potentials for fold assessment, *Protein Science*, **11**, 430–448.
- Meng, X., Zhang, H., Mezei, M., dan Cui, M. (2011): Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr Comput Aided Drug Des*, **7**, 146-157.
- Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., dan DesJarlais, R. L. (2005): Docking: Successes and challenges, *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 323-333.
- Morris, G. M. dan Lim-Wilby M. (2008): Molecular docking, *Methods in Molecular Biology*, **443**, 365-382.
- Murthy, V. L. dan Stern, L. J. (1997): The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: Implications for the structural basis of the specificity of peptide binding, *Structure*, **5**, 1385–1396.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., dan Lund, O. (2007): Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method, *BMC Bioinformatics*, **8**, 238-249.
- Nugent, T. dan Jones, D. T. (2009): Transmembrane protein topology prediction using support vector machines, *BMC Bioinformatics*, **10**, 159-169.
- Oelmeier, S. A., Dimer, F., dan Hubbuch, J. (2012): Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems - Single PEG-molecules in solution, *BMC Biophysics*, **5**, 14-26.
- Palmer, M., Parker, J., Modi, S., Butts, C., Smylie, M., Meikle, A., Kehoe M., dan MacLean G., Longenecker, M. (2001): Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer, *Clinical Lung Cancer*, **3**, 49-57.
- Pellegatta, S., Valletta, L., Corbetta, C., Patane, M., Zucca, I., Sirtori, F. R., Bruzzone, M. G., Fogliatto, G., Isacchi, A., Pollo, B., dan Finocchiaro, G. (2015): Effective immuno-targeting of the IDH1 mutation R132H in a

- murine model of intracranial glioma, *Acta Neuropathologica Communications*, **3**, 1-12.
- Pineiro, A. (2009): Introduction to molecular dynamics simulations for biological systems, 1-17.
- Pitman, M. R. dan Menz R. I.. (2006): Methods for protein homology modelling, *Applied Mycology and Biotechnology*, **6**, 37- 59.
- Prendergast, G. C. dan Jaffe, E. M. (Ed.). (2013): Cancer immunotherapy, *Elsevier Inc.*, Oxford, 55-70.
- Radji, M. (2009): Vaksin kanker, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, **6**, 109-118.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. (2010): I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction, *nature protocols*, **5**, 725-738.
- Sali, A. dan Blundell, T.L. (1993): Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *JMB*, **234**, 779-815.
- Sampson, J. H. (Ed.). (2016): The duke glioma handbook: Pathology, diagnosis, and management, *Cambridge University Press*, Cambridge, 1-25.
- Schiewe, A. J. dan Haworth, I. S. (2007): Structure-based prediction of MHC-peptide association: Algorithm comparison and application to cancer vaccine design, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **26**, 667-675.
- Schiffman, K. dan Disis, M. L. (2001): Commentary on “phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non–small-cell lung cancer”, *Clinical Lung Cancer*, 58.
- Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., Keil, M., Balß, J., Rauschenbach, K., Grabowska, A. K., Vogler, I., Diekmann, J., Trautwein, N., Eichmüller, S. B., Okun, J., Stevanovic, S., Riemer, A. B., Sahin, U., Friese, M. A., Beckhove, P., Deimling, A., Wick, W., dan Platten, M. (2014): Avaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity, *Nature*, 1-17.
- Schumacher, T., Bunse, L., Wick W., dan Platten, M. (2014): Mutant IDH1: An immunotherapeutic target in tumors, *OncoImmunology*, **3**, 1-2.
- Sela-Culang, I., Ofran, Y., dan Peters, B. (2015): Antibody specific epitope prediction-emergence of a new paradigm, *Current Opinion in Virology*, **11**, 98-102.
- Shen, M. dan Sali, A. (2006): Statistical potential for assessment and prediction of protein structures, *Protein Sci*, **15**, 2507-2524.
- Summa, C. M. and Levitt, M. (2007): Near-native structure refinement using in vacuo energy minimization, *PNAS*, **104**, 3177–3182.
- Sung, M. H. dan Simon, R. (2004): Candidate epitope identification using peptide property models: Application to cancer immunotherapy, *Methods*, **34**, 460-467.
- Susmiarsih, T. dan Trimarsanto, H. (2013): kajian bioinformatika uncoupling protein 2 (UCP2) dan mutasi Ala55Val UCP2 pada obesitas dan diabetes melitus tipe 2 (DMT2), *Majalah Kesehatan Pharmamedika*, **5**, 1-14.
- Suzuki, J. (Ed.). (1988): Treatment of glioma, *Springer Japan*, Tokyo.
- Theory of Molecular Dynamics Simulations, diperoleh melalui situs internet: http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/pages/MD.Part1.html. Diunduh pada tanggal 23 September 2016.

- Theresa, L. P., Moustakas, D., Brozell, S., Carrascal, N., Mukherjee, S., Balias, T., Allen, W. J., Holden, P., Pegg, S., Raha, K., Shivakumar, D., Rizzo, R., Case, D., Shoichet, B., dan Kuntz, I. (2015): Dock 6.7 user manual, Reagents of the University of California.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W. M., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B. Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris L. G. T., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K., dan Chan, T. A. (2012): IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype, *Nature*, 483, 479-483.
- Vail, M. E., Murone, C., Tan, A., Hii, L., Abebe, D., Janes, P. W., Lee, F., Baer, M., Palath, V., Bebbington, C., Yarranton, G., Llerena, C., Garic, S., Abramson, D., Cartwright, G., Scott, A. M., dan Lackmann, M. (2014): Targeting EphA3 inhibits cancer growth by disrupting the tumor stromal microenvironment, *Cancer Research*, **74**, 4470-4481.
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., dan Peter, S. B. (2008): A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach, *PLoS Comput Biol*, **4**, 1-10.
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., dan Nielsen, M., Peters, B. (2010): Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules, *BMC Bioinformatics*, **11**, 568-579.
- Webb, B. dan Sali, A. (2014): Comparative protein structure modeling using Modeller, *Current Protocols in Bioinformatics*, **5**, 1-32.
- Wiederstein, M. dan Sippl, M. J. (2007): ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Research*, **35**, 407-410.
- Yamanaka, R. (Ed.). (2012): Glioma : Immunotherapeutic approaches, *Springer Science+Business Media*, New York, 1-53.
- Yang, B., Zhong, C., Peng, Y., Lai, Z., dan Ding, J. (2010): Molecular mechanisms of “off-on switch” of activities of human IDH1 by tumor-associated mutation R132H, *Cell Research*, **20**, 1188-1200.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., dan Zhang, Y. (2015): The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction, *Nature Methods*, **12**, 7-18.
- Zhang, Y. (2008): I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics*, **9**, 40-47.