

Identifikasi Inhibitor Protease NS2B/NS3 Virus Dengue Berbasis Flavonol melalui Farmakologi Jaringan dan Penambatan Molekuler

Neni Frimayanti^{*1}, Haiyul Fadhli¹, Mazani Febriana¹

Artikel Penelitian

Abstract: The dengue virus still poses a serious threat to world health, and there are still few effective inhibitors that target the NS2B/NS3 protease. This study used an integrated in silico methodology to find possible anti-dengue candidates from *Artocarpus heterophyllus* flavonol molecules. After investigating compound-target relationships using network pharmacology, structure-based molecular docking was used to evaluate binding affinities toward the NS2B/NS3 protease (PDB ID: 2FOM), and ADME profiling was included. Compounds 6 and 9 outperformed the other ligands in the evaluation in terms of expected binding energies and stable accommodation in the active site, which included close spatial interaction with the residues of the catalytic triad (His51, Asp75, and Ser135). For the most part, their anticipated pharmacokinetic characteristics were within reasonable bounds for early-stage medication candidates. All things considered, our findings suggest that the chosen flavonols would be good places to start when developing dengue antivirals; still, further experimental testing is necessary to confirm their biological activity.

Keywords: dengue, flavonol, network pharmacology, molecular docking, NS2B/NS3 protease

Sekolah tinggi ilmu farmasi
Riau, Jl Kamboja Panam
Pekanbaru Inodnesia, 28293

Korespondensi:

Neni Frimayanti
nenifrimayanti@stifar-riau.ac.id

Abstrak: Virus dengue masih menjadi tantangan kesehatan global yang signifikan, sementara penemuan inhibitor efektif yang menargetkan protease NS2B/NS3 masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandidat anti-dengue potensial dari senyawa flavonol *Artocarpus heterophyllus* melalui alur kerja in silico terintegrasi. Pendekatan network pharmacology terlebih dahulu digunakan untuk mengeksplorasi hubungan senyawa-target, kemudian dilanjutkan dengan molecular docking berbasis struktur untuk mengevaluasi afinitas pengikatan terhadap protease NS2B/NS3 (PDB ID: 2FOM), yang dilengkapi dengan profil ADME. Di antara ligan yang dievaluasi, senyawa 6 dan 9 menunjukkan energi ikatan prediktif yang menguntungkan serta orientasi yang stabil pada sisi aktif, termasuk kedekatan spasial dengan residu catalytic triad (His51, Asp75, dan Ser135). Profil farmakokinetik yang diprediksi juga umumnya berada dalam kisaran yang dapat diterima untuk kandidat obat tahap awal. Secara keseluruhan, temuan ini menunjukkan bahwa flavonol terpilih berpotensi menjadi titik awal yang menjanjikan untuk pengembangan antivirus dengue; namun demikian, validasi eksperimental lebih lanjut masih diperlukan untuk mengonfirmasi aktivitas biologisnya.

Kata kunci: dengue, flavonol, network pharmacology, molekular docking, NS2B/NS3 protease



Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 International License

Pendahuluan

Dengue adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *Dengue* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*. Penyakit ini telah menjadi salah satu ancaman kesehatan global, terutama di negara tropis dan subtropis, dengan lebih dari 390 juta infeksi terjadi setiap tahun di seluruh dunia (1). Hingga saat ini, telah teridentifikasi lima serotipe virus *Dengue*, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, dan DENV-5. DENV-5 adalah serotipe baru yang ditemukan dan dilaporkan pada Oktober 2013 di Bangkok (2).

Genom virus *Dengue* (DENV) mengodekan tiga jenis protein struktural (C, prM, dan E) serta tujuh protein non-struktural, yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5. Dari protein non-struktural tersebut, kompleks NS2B/NS3 protease berperan penting dalam replikasi virus, karena berfungsi memotong poliprotein menjadi protein fungsional sebelum virus baru terbentuk. Oleh karena itu, NS2B/NS3 dianggap sebagai salah satu target utama dalam pengembangan obat anti *Dengue*.

Sampai saat ini, belum ditemukan obat khusus untuk mengobati infeksi virus *Dengue*, pengobatan yang diberikan kepada pasien masih terbatas pada penanganan gejala dan perawatan pendukung. Kondisi ini menunjukkan betapa pentingnya upaya pengembangan obat baru yang efektif untuk mengatasi infeksi virus *Dengue* (3).

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat ditemukan pada beberapa spesies tumbuhan. Senyawa ini terdiri dari beberapa jenis, seperti auron, flavon, flavanon, flavonol, dan lain sebagainya. Beberapa senyawa flavonoid alami ini telah dilaporkan berpotensi untuk dikembangkan sebagai antivirus *Dengue*. Menurut (4) quercetin menghambat replikasi virus *Dengue* dengan nilai IC_{50} sebesar 18,406 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai korelasi sebesar 0,8934. Senyawa Flavonol lain (fisetin) menunjukkan aktivitas antivirus terhadap virus *Dengue* serotipe 2 DENV-2 strain NGC pada sel vero, baik ketika diberikan sebelum infeksi IC_{50} sebesar 43,12 $\mu\text{g/mL}$ maupun setelah infeksi IC_{50} sebesar 55 $\mu\text{g/mL}$ (5).

Pendekatan *network pharmacology* memungkinkan analisis hubungan senyawa

dengan berbagai target biologis (6), sementara molecular docking digunakan untuk memprediksi interaksi antara ligan (senyawa flavonol) dengan reseptor (protein target). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi potensi senyawa flavonol dari database KNApSACk sebagai kandidat inhibitor virus *Dengue* melalui pendekatan komputasional untuk mendukung penemuan obat berbasis bahan alam.

Meskipun sejumlah flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antivirus terhadap virus *dengue*, akan tetapi penerapan pendekatan terintegrasi dalam studi inhibitor *dengue* masih relatif terbatas. Kombinasi *network pharmacology* dan *molecular docking* untuk mengevaluasi quercetin terhadap DENV-2, yang berhasil mengidentifikasi 38 gen hub yang berasosiasi dengan senyawa tersebut (7). Sementara itu, simulasi dinamika molekul, serta validasi eksperimental (*in vitro antiviral assays*) pada bioflavonoid dari *Azadirachta indica*, dan menunjukkan bahwa kaempferol 3-O- β -rutinoside mampu mencapai inhibisi virus sebesar 77,7% (8). Meskipun demikian, sebagian besar penelitian berikutnya masih didominasi oleh pendekatan komputasi parsial (9, 10). Yang menerapkan *molecular docking* yang dikombinasikan dengan dinamika molekul, namun belum mengintegrasikan *network pharmacology*. fitokimia seperti hesperidin dan kaempferol menunjukkan potensi yang menjanjikan, kajian flavonol berbasis multi-target yang komprehensif masih terbatas. Oleh karena itu, kesenjangan dalam pendekatan yang sistematis dan terintegrasi—khususnya yang menargetkan subkelas flavonol pada target viral yang tervalidasi masih tetap terbuka (11).

sebagian besar penelitian terdahulu masih menilai senyawa secara individual dan umumnya menggunakan pendekatan komputasi yang terpisah. Pendekatan terpadu yang mengombinasikan *network pharmacology* dan *molecular docking*, khususnya yang difokuskan pada subkelas flavonol terhadap target viral yang telah tervalidasi, masih relatif jarang dilaporkan. Akibatnya, potensi multi-target flavonol dalam konteks infeksi *dengue* belum sepenuhnya dipahami secara komprehensif.

NS2B/NS3 protease dipilih sebagai target utama dalam penelitian ini karena perannya yang krusial dalam pemrosesan poliprotein dan replikasi virus dengue, serta pengakuannya yang luas sebagai target strategis dalam pengembangan antivirus. Dalam kerangka tersebut, *network pharmacology* dimanfaatkan sebagai pendekatan tingkat sistem untuk memetakan keterkaitan senyawa–target, yang kemudian diperdalam melalui *molecular docking* terarah pada protease NS2B/NS3. Berdasarkan pertimbangan ini, kami menghipotesiskan bahwa flavonol terpilih berpotensi menunjukkan interaksi prediktif yang menguntungkan dengan protease NS2B/NS3 dan layak dipertimbangkan sebagai kandidat awal inhibitor virus dengue.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 25 senyawa flavonol yang diperoleh dari *website KNApSack*. Bahan-bahan yang digunakan dalam *Molecular docking* adalah struktur protein target 2FOM dalam format PDB. Struktur *ligan* yang digunakan adalah 25 senyawa flavonol dan Panduratin A sebagai kontrol positif.

Metode

Pengambilan Data Senyawa Metabolit Sekunder

Data senyawa Flavonol diperoleh dari KNApSack dengan membuka situs 'KNApSackfamily.com'. Ketik pencarian dengan kata kunci 'Flavonol', lalu pilih kolom 'All Type' setelah itu klik 'List' dan akan tampil 25 senyawa Flavonol yang digunakan pada prediksi bioavailabilitas ini.

Skrining Senyawa Kimia dengan *SwissADME*

25 senyawa yang didapatkan diinput ke dalam webserver *SwissADME* dengan membuka situs "<http://www.SwissADME.ch/index.php>". Pada kolom bagian 'Enter a list of SMILES here', masukan rumus SMILES yang diperoleh dari web KNApSack lalu klik 'Run'. Senyawa dipilih berdasarkan aturan Lipinski's Rule of Five dengan kriteria Molecule Weight <500, Lipophilicity (MLogP) <5, H-Bond Acceptor <10, H-Bond Donors <5, Rotable Bonds <10, dan Lipinski

terindikasi Yes dengan maksimum satu violation (12).

Prediksi Target Protein dan Analisis Network farmakologi

Pendekatan *network pharmacology* digunakan dalam penelitian ini sebagai tahap penyaringan berbasis sistem untuk mengeksplorasi kemungkinan hubungan antara senyawa flavonol dan target biologisnya, sekaligus menilai potensi karakteristik multi-target dari senyawa tersebut. Seluruh tahapan analisis disusun secara berurutan guna menjaga transparansi prosedur serta memastikan keterulangan (*reproducibility*) penelitian.

Senyawa flavonol yang telah memenuhi kriteria skrining ADME selanjutnya diproses untuk prediksi target protein menggunakan webserver SwissTargetPrediction

(<http://www.swisstargetprediction.ch/>).

Struktur senyawa dimasukkan dalam format SMILES dengan pemilihan spesies *Homo sapiens*. Untuk meningkatkan keandalan hasil, hanya target protein dengan nilai probabilitas lebih besar dari nol yang dipertahankan untuk analisis berikutnya.

Daftar protein yang berasosiasi dengan penyakit dengue diperoleh dari basis data GeneCards (<https://www.genecards.org/>) menggunakan kata kunci "dengue". Seluruh target yang diperoleh kemudian dikompilasi dan disaring untuk menghilangkan entri duplikat. Selanjutnya, dilakukan analisis irisan antara target senyawa flavonol dan protein terkait dengue menggunakan diagram Venn melalui platform Venny 2.1, dengan tujuan mengidentifikasi kandidat target yang berpotensi relevan secara biologis.

Protein hasil irisan kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan STRING-DB (<https://string-db.org/>) untuk mengevaluasi jejaring interaksi protein–protein (*protein–protein interaction*, PPI), termasuk hubungan fungsional dan asosiasi biologis yang mungkin terlibat dalam patogenesis dengue. Parameter organisme ditetapkan pada *Homo sapiens* dengan pengaturan default STRING guna menjaga konsistensi analisis.

Persiapan dan Preparasi Protein

Struktur protein 2FOM diunduh dari situs www.rcsb.org. Struktur kristal protein dipreparasi menggunakan aplikasi BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DSV) 2020 dengan menghilangkan molekul air dan ligan awal. Preparasi kedua menggunakan Molecular Operating Environment (MOE) 2022.0901 dengan penambahan hidrogen, energy minimize menggunakan force field CHARMM27, dan RMS Gradient 0,001 (kcal/mol/Å).

Preparasi Ligan

Struktur senyawa flavonol digambar menggunakan Chemdraw Professional 15.0 dan dipreparasi menggunakan MOE 2022.0901. Energy minimize dilakukan dengan force field Merck Molecular Force Field 94x (MMFF94x) dengan RMS gradient 0,0001. Ligan disimpan dalam database format mdb.

Simulasi Docking

Simulasi docking dilakukan menggunakan MOE 2022.0901. Penentuan sisi aktif didasarkan pada keberadaan *catalytic triad* yang telah dilaporkan pada protease NS2B/NS3, yaitu His51, Asp75, dan Ser135. Dengan pendekatan *site-directed docking*, area pengikatan difokuskan pada wilayah katalitik yang relevan secara biologis sehingga orientasi ligan yang dihasilkan lebih representatif terhadap kondisi fungsional enzim.

Proses docking dijalankan menggunakan metode *placement Triangle Matcher* dengan pembangkitan awal sebanyak 50 *poses*. Pose yang dihasilkan kemudian diseleksi melalui tahap *refinement* menggunakan Forcefield refinement, dengan 10 pose terbaik dipertahankan untuk analisis lanjutan. Estimasi afinitas pengikatan dilakukan menggunakan *scoring function* bawaan MOE, yaitu London dG pada tahap awal dan

GBVI/WSA dG pada tahap *refinement*, untuk memperkirakan energi bebas ikatan (*binding free energy*) antara ligan dan reseptor.

Penentuan Fitur *Pharmacophore*

Fitur *Pharmacophore* ditentukan menggunakan MOE dengan menu '*Pharmacophore Query Editor*'. Dipilih tiga titik anotasi terdekat pada struktur ligan dan diklik '*Feature*' untuk menghasilkan fitur *Pharmacophore* hasil interaksi ligan dan reseptor.

Hasil dan Diskusi

Skrining awal untuk mengevaluasi potensi senyawa flavonol sebagai agen anti-dengue dilakukan melalui pendekatan *in silico*. Metode *in silico* sendiri merupakan pendekatan penelitian yang mengandalkan teknologi komputer dan basis data digital. Melalui pendekatan ini, aktivitas biologis suatu senyawa dapat diprediksi sebelum dilakukan uji eksperimental di laboratorium. Dalam penelitian ini, digunakan dua metode utama, yaitu *network pharmacology* dan *molecular docking*. Kedua metode tersebut merupakan pendekatan terpadu yang menggabungkan bioinformatika dan komputasi untuk mengidentifikasi target-target penting dari berbagai senyawa (13)

Dari 25 senyawa flavonol yang diperoleh dari database *KNAPSAcK*, hasil skrining menggunakan *SwissADME* berdasarkan aturan Lipinski Rule of Five menunjukkan 21 senyawa memenuhi kriteria dengan indikasi "Yes", sedangkan 4 senyawa tidak memenuhi kriteria karena memiliki 3 pelanggaran pada parameter *Molecule Weight*, *H-Bond Acceptor* dan *H-Bond Donors*. Hasil screening senyawa flavonol menggunakan *swissADME* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Skrining Senyawa Flavonol dengan Webserver SwissADME

No	Senyawa	Parameter					Lipinski
		berat molekul (g/mo)	Log P	Ikatan Hidrogen Donor	Ikatan Hidrogen Aseptor	Atom Berotasi	
1	Linarin	592.55	-2.76	7	14	7	No
2	Resokaempferol	270.24	0.52	3	5	1	Yes
3	Kaempferol	286.24	-0.03	4	6	1	Yes
4	Morin	302.24	-0.56	5	7	1	Yes
5	Licoflavonol	354.35	1.09	4	6	3	Yes
6	Isolicoflavonol	354.35	1.09	4	6	3	Yes
7	Brousoflavonol F	422.47	2.09	4	6	5	Yes
8	Brousoflavonol B	452.5	1.77	4	7	6	Yes
9	Brousoflavonol C	506.59	2.48	5	7	7	Yes
10	Brousoflavonol G	506.59	2.48	5	7	7	Yes
11	Brousoflavonol A	450.48	1.77	3	7	4	Yes
12	Brousoflavonol D	504.57	2.48	4	7	5	Yes
13	Brousoflavonol E	506.59	2.55	4	7	5	Yes
14	Kaempferol 3-O-sophoroside	610.52	-4.16	10	16	7	No
15	Broussonol E	438.47	1.56	5	7	5	Yes
16	Glycyrrhiza flavonol A	370.35	0.36	4	7	1	Yes
17	Denticulaflavonol	558.7	4.01	4	6	6	Yes
18	6-Hydroxykaempferol 3-rutinoside	610.52	-3.89	10	16	6	No
19	Pancibiflavonol	572.47	-0.57	8	12	3	No
20	5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-geranylflavonol	438.47	1.56	5	7	6	Yes
21	5,7,4'-Trihydroxy-8-p-hydroxybenzylidihydroflavonol	394.37	0.77	5	7	3	Yes
22	3-Hydroxyflavone Flavonol	238.24	1.66	1	3	1	Yes
23	7,8-Dihydroxyflavonol	270.24	0.52	3	5	1	Yes
24	Maackiaflavonol	322.35	2.2	3	4	3	Yes
25	Dihydroflavonol	240.25	1.58	1	3	1	Yes

Hasil prediksi ADME menunjukkan bahwa mayoritas senyawa flavonol memiliki profil farmakokinetik yang masih berada dalam kisaran yang dapat diterima untuk kandidat obat pada tahap awal penemuan. Evaluasi terhadap parameter utama, seperti kepatuhan terhadap aturan Lipinski, nilai *topological polar surface area* (TPSA), serta tingkat lipofilisitas,

mengindikasikan bahwa beberapa senyawa berpotensi mendukung absorpsi oral yang memadai. Meskipun demikian, variasi yang teramati pada nilai logP, ukuran molekul, dan parameter yang berkaitan dengan permeabilitas menunjukkan bahwa tidak semua senyawa memperlihatkan profil farmakokinetik yang sama optimalnya.

Kriteria Lipinski Rule of Five menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa flavonol memiliki sifat drug-like yang baik, mengindikasikan potensi bioavailabilitas oral yang memadai. Parameter berat molekul, *lipophilicity*, dan kemampuan membentuk ikatan hidrogen merupakan faktor kunci dalam penetrasi membran sel (14).

Berat molekul merupakan salah satu parameter penting yang memengaruhi kemampuan suatu senyawa untuk menembus membran sel melalui mekanisme difusi pasif. Senyawa dengan berat molekul di atas 500 g/mol cenderung memiliki kemampuan difusi yang lebih besar. Selain itu, parameter MLogP digunakan untuk menggambarkan kelarutan senyawa dalam pelarut oktanol/air, di mana semakin tinggi nilai LogP menandakan sifat senyawa yang semakin hidrofobik. Senyawa yang sangat hidrofobik umumnya menunjukkan tingkat toksisitas lebih tinggi karena cenderung bertahan lebih lama dalam lapisan lipid bilayer dan tersebar luas dalam tubuh, sehingga mengurangi selektivitas terhadap target biologis. Sebaliknya, nilai LogP yang terlalu rendah (negatif) dapat menghambat kemampuan senyawa untuk menembus membran sel (14).

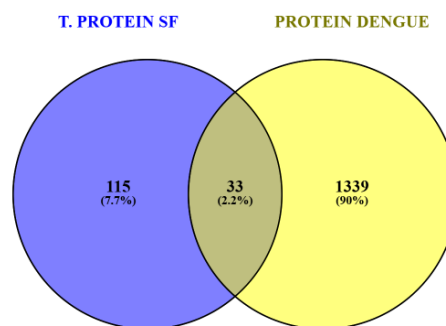
Selain itu, jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen juga memengaruhi proses absorpsi senyawa. Semakin banyak jumlah ikatan hidrogen (lebih dari 10 donor dan lebih dari 5 akseptor), semakin besar energi yang dibutuhkan tubuh untuk menyerap senyawa tersebut. Karakteristik ini juga berhubungan dengan kemampuan senyawa dalam membentuk kelat serta sifat keasamannya. *Lipinski's Rule of Five* digunakan sebagai pedoman dalam mengevaluasi kelarutan senyawa untuk penetrasi sel melalui difusi pasif (15).

Pengujian target protein dari 21 senyawa flavonol menggunakan *SwissTargetPrediction* menunjukkan bahwa 20 senyawa memiliki target protein sebanyak 148 protein target, sedangkan 1 senyawa tidak memiliki target protein yang dapat diprediksi. Identifikasi target senyawa juga diperkuat melalui analisis prediksi probabilitas target menggunakan *SwissTargetPrediction*, yang memberikan estimasi kesamaan target senyawa dengan akurasi tinggi. Kemudian protein yang

dapat berinteraksi dengan senyawa flavonol akan diprediksi menggunakan *website SwissTargetPrediction*. Analisis ini berguna untuk memprediksi target protein dari masing-masing senyawa flavonol. Dapat dilihat jika hasil analisis memiliki probabilitas > 0 maka dapat dilanjutkan untuk mengetahui protein target sesuai dengan penyakit yang dianalisa (16).

Analisis protein target menggunakan *GeneCard* dengan kata kunci "Dengue" mengidentifikasi 1.374 protein terkait penyakit *dengue*.

Hasil analisis menggunakan Diagram Venn (gambar 1) menunjukkan 33 protein target yang terkait antara senyawa flavonol dengan penyakit *dengue*. Namun, analisis menggunakan String-DB tidak ditemukan protein yang sesuai dengan penyakit *dengue*, sehingga penelitian difokuskan pada protein NS2B/NS3 protease yang telah terbukti sebagai target utama dalam replikasi virus *dengue*.



Gambar 1. Daftar Kode Protein Hasil dari Diagram Venn antara Protein Target Senyawa Flavonol dan Protein Penyakit Dengue

Keterangan :

Warna biru : Target protein senyawa flavonol

Warna kuning : Protein Dengue

Warna kuning gelap (bagian tengah) : Keterkaitan protein target senyawa flavonol dengan protein yang terlibat dengan penyakit *dengue*

Network pharmacology digunakan untuk menentukan protein yang sesuai dengan senyawa flavonol dari *database KNApSack*, akan tetapi setelah dilakukan pengambilan data senyawa metabolit sekunder melalui *website KNApSack*, skrining senyawa kimia dengan memprediksi karakteristik *ADME*, menggunakan *swissadme*, prediksi target protein dengan *swisstargetprediction*, analisis protein target

menggunakan *genecard*, hasil keduanya digabungkan dan dianalisis dalam *diagram venn* untuk melihat keterkaitan protein antara senyawa flavonol dengan protein yang terlibat dengan penyakit *dengue*, protein yang terkait dimasukkan ke dalam *string-db* untuk mendapatkan data aktivitas biologis, penyakit terkait, dan gambaran jejaring protein. Setelah dilakukan *network farmakologi* tidak ditemukan protein yang sesuai dengan anti *dengue*.

Karena itulah peneliti melanjutkan penelitian dengan menggunakan protein 2FOM merupakan protein yang spesifik untuk DENV-2 NS2b/NS3 selain itu juga karna 2FOM sudah banyak digunakan pada penelitian sebelumnya dan juga sudah terbukti melalui uji *in vitro*. *Molecular docking* adalah sebuah metode yang dapat digunakan untuk melakukan investigasi, interpretasi, dan identifikasi sifat molekuler dari suatu senyawa dalam bentuk struktur 2D dan 3D dengan memprediksi orientasi dari kompleks yang terbentuk antara ligan dan protein. Teknologi komputasi *molecular docking* menjadi salah satu solusi yang dapat mengurangi waktu dan biaya serta faktor coba-coba dalam desain obat. Mengingat proses desain obat secara konvensional yang sangat rumit dan membutuhkan waktu dan biaya yang cukup banyak (17). Tujuan dilakukan *docking* adalah untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa yang akan berinteraksi dengan sisi aktif protein (18).

Molecular docking dan studi *Pharmacophore* dari 20 senyawa flavonol yang diperoleh dari database *KNAPSAck* dengan protein target (PDB ID: 2FOM) yang bertujuan untuk mengetahui potensi dan mengidentifikasi ligan mana yang berpotensi sebagai anti *dengue*. Ada beberapa parameter untuk mengamati interaksi yang terjadi pada *molecular docking* yaitu energi bebas ikatan, nilai RMSD, ikatan kimia yang terbentuk seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, ikatan van der Waals dan *binding factor* (18). *Molecular docking* dikatakan valid jika memiliki nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ (19). Nilai RMSD menunjukkan bahwa nilai penyimpangan atau kesalahan yang terjadi ketika melakukan *docking*. Semakin kecil nilai RMSD maka semakin kecil pula nilai penyimpangan atau kesalahan yang terjadi saat melakukan *docking* (20).

Sebelum studi *molekular docking* dijalankan, dilakukan pengaturan sisi aktif pada protein. Sisi aktif pada protein perlu diatur supaya ligan hanya diuji pada bagian yang benar-benar penting untuk kerja protein. Pada penelitian ini dipilih *site 2* yang terdiri dari 13 residu asam amino (Ile36, Met49, His51, Val52, Leu128, Phe130, Ser131, Pro132, Gly133, Ser135, Tyr150, Gly151, Gly153), karena pada *site 2* terdapat catalytic triad dari protein 2FOM yaitu His 51 dan Ser 135. Pilih sebagai target dan diset sebagai dummy atom proses docking akan difokuskan pada area tersebut sehingga interaksi antara ligan dan protein menjadi lebih spesifik, selanjutnya lakukan studi *molekular docking*. Mengatur sisi aktif bertujuan agar proses docking lebih tepat sasaran, hasilnya lebih akurat, proses komputasinya lebih cepat.

20 senyawa flavonol menunjukkan nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$, mengkonfirmasi validitas metode docking yang digunakan. Kontrol positif panduratin A menunjukkan energi bebas ikatan -6.2808 kcal/mol dengan RMSD 1.0714 Å dan dapat berikatan dengan 15 residu asam amino. Panduratin A membentuk ikatan hidrogen pada residu asam amino Pro132 dan Ser135, interaksi van der Waals dengan Asp75, serta interaksi hidrofobik dengan Lys74.

Berdasarkan tabel 2 menunjukkan bahwa nilai energi bebas ikatan, dua senyawa yaitu senyawa 6 dan senyawa 9 menunjukkan potensi terbaik dibandingkan kontrol positif. Berdasarkan evaluasi komprehensif hasil *molecular docking*, senyawa 6 dan senyawa 9 diprioritaskan sebagai kandidat paling menjanjikan dalam penelitian ini. Pemilihan tersebut tidak hanya didasarkan pada satu parameter, tetapi mempertimbangkan beberapa indikator kunci secara simultan. Kedua senyawa menunjukkan nilai energi bebas ikatan (S) yang lebih rendah dibandingkan sebagian besar ligan uji dan sebanding dengan kontrol positif panduratin A, yang mengindikasikan afinitas pengikatan yang relatif kuat terhadap protease NS2B/NS3. Selain itu, nilai RMSD yang berada di bawah ambang batas yang dapat diterima ($\leq 2 \text{ \AA}$) menunjukkan bahwa pose docking kedua senyawa stabil dan dapat dipercaya.

Tabel 2. Hasil *Docking* 20 Senyawa Flavonol dan Panduratin A

Ligan	S (kCal /mol)	RMSD	H-Bond	Hidro fobik	Van der Walls	<i>The Other Interac ti-ons</i>	<i>Binding Factor</i>
Kontrol Positif (Panduratin A)	-6.2808	1.0714	Pro 132 Ser 135	Lys 74	Asp 75	His 51 Asn 152 Gly153 Gly 151 Gly 133 Ser 131 Tyr 150 Leu 128 Met 49 Phe 130 Val 52	15
Senyawa 2	-5.1696	0.7716	Gly 153	Lys 74	Asp 75	His 51 Ser 135 Tyr 150 Gly 151 Asn 152 Pro 132 Leu 128 Phe 130 Met 49	12
Senyawa 3	-5.2371	1.2492	Pro 132	-	Asp 75	His 51 Ser 135 Ser 131 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Gly 153 Asn 152 Leu 128 Phe 130 Met 49	12
Senyawa 4	-5.9834	1.2105	Pro 132 Asp 75	-	Asp 75	His 51 Ser 135 Ser 131 Tyr 150 Gly 151 Gly 153 Asn 152 Leu 128 Phe 130 Met 49 Val 154	12
Senyawa 5	-6.0445	1.0999	His 51 Gly153	Arg 54	Asp 75	Gly151 Tyr161	9

Ligan	S (kCal/mol)	RMSD	H-Bond	Hidro fobik	Van der Walls	The Other Interac ti- ons	Binding Factor
			Ser 135			Tyr 150 Pro 132 Leu 128 Phe 130	
Senyawa 6	-6.1864	1.3653	Gly153 Asn 152 Asp75	Arg 54 Lys 74	Asp 75	His 51 Ser 135 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Pro 132 Leu 128 Phe 130 Met 49	13
Senyawa 7	-6.8235	1.3427	Pro 132 Gly 153 Phe 130 Asp 75	-	Asp 75	His 51 Ser 135 Gly151 Tyr161 Tyr 150 Leu 128 Met 49	10
Senyawa 8	-6.9366	1.3403	Gly 153 Asn152	Lys 74	Asp 75	His 51 Ser 135 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Pro 132 Leu 128 Phe 130	11
Senyawa 9	-6.8559	1.2384	-	Lys 74 Arg 54	Asp 75	His 51 Ser 135 Ser 131 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Gly 153 Asn 152 Pro 132 Leu 128 Val 52 Met 49	13
Senyawa 10	-6.7421	1.7249	Pro 132 Gly 153 Gly 151	-	Asp 75	His 51 Ser 135 Tyr 150 Tyr 161 Asn 152 Leu 128 Phe 130	10

Ligan	S (kCal /mol)	RMSD	H-Bond	Hidro fobik	Van der Walls	<i>The Other Interac ti- ons</i>	<i>Binding Factor</i>
						Val 52	
Senyawa 11	-6.4879	1.5066	Gly 153	-	Asp75	His 51 Ser 135 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Asn 152 Pro 132 Leu 128 Met 49 Val 154	10
Senyawa 12	-6.9571	1.2854	Ser 135 Asp 75	Arg 54	Asp 75	His 51 Tyr 150 Gly 151 Gly 153 Asn 152 Pro 132 Leu 128 Val 52 Val 154 Met 49	11
Senyawa 13	-7.1477	1.626	Gly 153 Ser 135	Lys 74 Arg 54	Asp 75	His 51 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Asn 152 Pro 132 Phe 130 Leu 128 Val 154 Met 49	12
Senyawa 15	-.64427	1.7296	Pro 132 Gly 151	-	-	His 51 Gln 35 Ser 135 Ser 131 Tyr 150 Gly 133 Gly 153 Phe 130 Leu 128 Val 52 Ile 36	11
Senyawa 16	-6.0559	1.7113	Leu 128 Phe 130	-	Asp 75	His 51 Ser 135 Ser 131 Tyr 150 Gly 151	12

Ligan	S (kCal/mol)	RMSD	H-Bond	Hidro fobik	Van der Walls	The Other Interac ti-ons	Binding Factor
						Gly 153 Asn 152 Pro 132 Met 49	
Senyawa 17	-6.9545	1.3918	Leu 128 Ser 135	Arg 54	Asp75	His 51 Tyr 150 Tyr 161 Gly 151 Gly 153 Phe 130 Pro 132 Val 154 Met 49	10
Senyawa 20	-6.6257	1.6202	Pro 132 Leu 128	-	-	His 51 Ser 135 Tyr 150 Ser 131 Gly 151 Gly 133 Phe 130 Val 52 Ile 36	10
Senyawa 22	-5.1754	1.0500	His 51 Asn 152	Lys 74	Asp 75	Ser 135 Gly 151 Gly 153 Pro 132 Met 49 Val 52	10
Senyawa 23	-5.1525	0.7457	Gly 153	Lys 74	Asp 75	His 51 Ser 135 Gly 151 Tyr 152 Asn 152 Pro 132 Leu 128 Met 49 Val 154	10
Senyawa 24	-5.6962	1.6146	Pro 132	Arg 54	Asp 75	His 51 Ser 135 Gly 151 Gly 153 Tyr 150 Asn 152 Met 49 Val 154 Val 52	10

Ligan	S (kCal/mol)	RMSD	H-Bond	Hidro fobik	Van der Walls	The Other Interac ti-ons	Binding Factor
Senyawa 25	-4.6240	1.3387	Asn 152 His 51 Ser 135	Lys 74	Asp75	Gly 151 Gly 153 Pro 132 Met 49 Val 154 Val 52	10

Meskipun beberapa senyawa lain—seperti senyawa 13, 12, 8, dan 7—menunjukkan nilai energi bebas ikatan yang cukup kompetitif pada hasil *molecular docking*, evaluasi lanjutan menunjukkan bahwa parameter energi saja belum memadai untuk menetapkan prioritas kandidat secara meyakinkan. Analisis komparatif mengungkap bahwa tidak semua senyawa dengan energi yang lebih rendah mampu mempertahankan kombinasi parameter penting lainnya, termasuk stabilitas pose docking (RMSD ≤ 2 Å), keterlibatan residu kunci pada *catalytic triad* (His51, Asp75, dan Ser135), serta kesesuaian pola interaksi dengan kontrol positif panduratin A.

Interaksi ligan dengan residu *catalytic triad* (His51, Asp75, dan Ser135) dianalisis lebih lanjut untuk menilai relevansi mekanistik dari hasil *molecular docking*. Ketiga residu ini diketahui berperan sentral dalam aktivitas katalitik protease NS2B/NS3, sehingga keterlibatan ligan pada wilayah tersebut dapat mencerminkan potensi gangguan terhadap fungsi enzim. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa senyawa 6 dan 9 mampu berorientasi dekat dengan residu-residu kunci tersebut serta membentuk interaksi non-kovalen yang mendukung stabilitas kompleks ligan-protein. Pola interaksi ini juga sejalan dengan yang diamati pada kontrol positif panduratin A, sehingga memperkuat indikasi bahwa kedua senyawa tersebut memiliki potensi untuk menghambat aktivitas protease NS2B/NS3, meskipun konfirmasi eksperimental lebih lanjut tetap diperlukan.

Senyawa 6 dan 9 menunjukkan profil yang lebih konsisten dan seimbang pada berbagai parameter tersebut. Kedua senyawa memperlihatkan keterlibatan yang lebih stabil pada wilayah katalitik serta *binding factor* yang relatif tinggi

dibandingkan ligan lainnya. Temuan ini menegaskan bahwa pendekatan prioritisasi berbasis multi-kriteria memberikan dasar evaluasi yang lebih andal dibandingkan penilaian yang hanya berfokus pada nilai energi bebas ikatan. Atas pertimbangan tersebut, senyawa 6 dan 9 dipilih sebagai kandidat utama untuk pembahasan lebih lanjut terkait potensinya sebagai inhibitor protease NS2B/NS3.

Energi bebas ikatan merupakan energi yang dibutuhkan oleh ligan untuk berikatan dengan proteinnya (reseptor). Ketika nilai energi bebas ikatan semakin kecil, maka interaksi antar ligan dan protein (reseptor) semakin kuat. Energi yang lebih rendah menunjukkan bahwa molekul berada dalam keadaan stabil, ini berarti lebih banyak energi yang dilepaskan saat ikatan terbentuk dan sulit untuk memisahkan ligan dan protein (21). Semakin kecil energi ikatan bebas maka semakin kuat ikatan antara ligan dan reseptornya maka akan sulit terlepas, begitu juga sebaliknya. Hal inilah yang menunjukkan bahwa kompleks ligan -protein tersebut semakin stabil (18). Selanjutnya adalah *Binding factor* yang digunakan untuk melihat kecocokan asam amino antara ligan dengan kontrol positif, semakin banyak kecocokan asam amino antara ligan uji dengan kontrol positif maka hasilnya semakin baik (18).

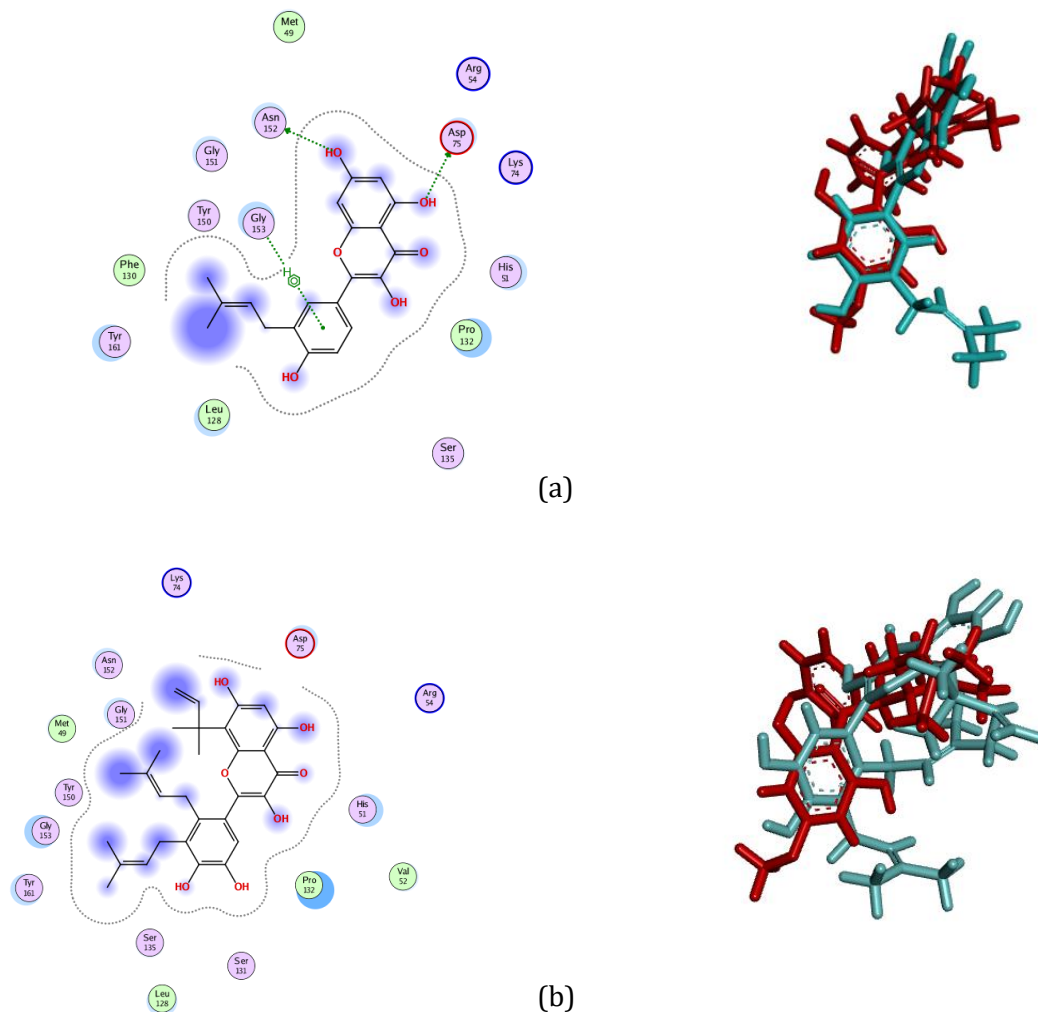
Parameter lainnya yaitu, ikatan kimia yang terbentuk seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan ikatan van der waals. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang lebih kuat dibandingkan ikatan van der waals, karena ikatan hidrogen dapat terbentuk meskipun antara ligan dan reseptor memiliki jarak yang cukup jauh. (18, 22). Ikatan Van der waals merupakan ikatan yang lemah, namun karena terjadinya dalam jumlah besar, maka ikatan Van der waals mempunyai

peran dalam menentukan stabilitas protein. Ikatan hidrofobik merupakan ikatan penggabungan antara daerah non polar ligan dengan daerah non polar reseptor, ikatan ini menghasilkan peningkatan energi bebas sehingga dapat menstabilkan ikatan ligan reseptor (23).

Proses *docking* terbagi atas dua tipe, yaitu *blind docking* dan *oriented docking*. *Blind docking* adalah proses *docking* yang dilakukan tanpa mengetahui letak sisi aktif dari reseptor dengan tepat, sedangkan *docking* merupakan proses *docking* yang dilakukan dengan telah mengetahui letak sisi aktif dari reseptor dengan tepat (24).

Pada penelitian ini, proses *docking* yang dilakukan dengan menggunakan metode *oriented docking* karena sudah diketahui sisi aktifnya yaitu His 51 Asp 75 Ser 135 (25).

Hasil visualisasi superimposisi menunjukkan bahwa senyawa 6 dan senyawa 9 memiliki konformasi yang sesuai dengan panduratin A sebagai kontrol positif. Hal ini mengkonfirmasi bahwa kedua senyawa dapat menempati situs aktif yang sama dengan orientasi yang tepat untuk berinteraksi dengan protein target. Hal ini ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Interaksi dan superimposisi (a) senyawa 6 (biru) (b) senyawa 9 (biru) dan kontrol positif (merah)

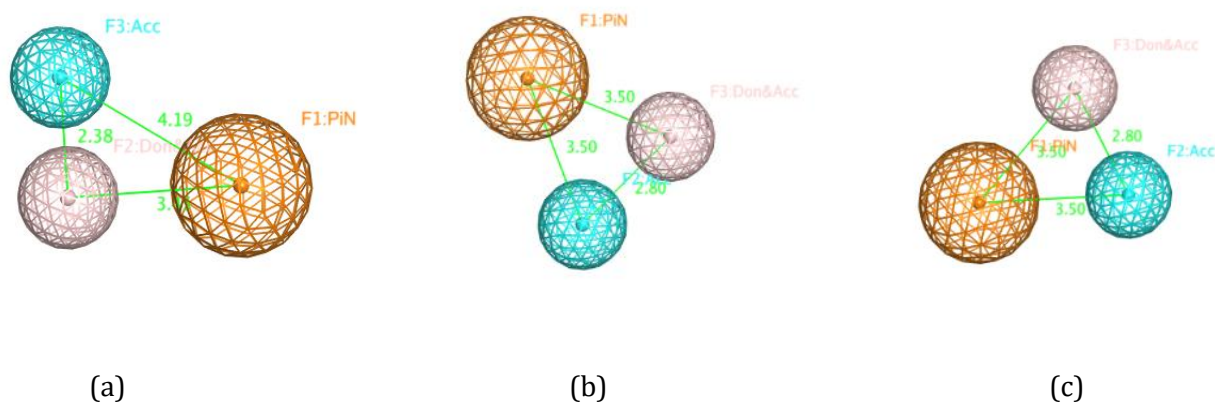
Setelah melakukan studi *molecular docking*, selanjutnya dilakukan studi *pharmacophore* yang bertujuan untuk menentukan fitur *pharmacophore* ligan yang aktif sebagai obat untuk anti *dengue*. *Pharmacophore* merupakan kerangka kerja molekul yang membawa fitur-fitur penting bertanggung jawab atas aktivitas biologis obat. Model *pharmacophore* dapat dilihat sebagai gambaran dari kumpulan atau beberapa *feature*. Elemen *pharmacophore* atau biasa disebut dengan *feature* adalah sekelompok atom yang memiliki ikatan hidrogen pendonor atau cincin aromatik secara umum yang dapat mengaktivasi suatu senyawa dengan memiliki respon terhadap protein target dan esensial untuk aktivitas suatu senyawa (26).

Analisis *pharmacophore* dalam penelitian ini digunakan sebagai pendekatan berbasis fitur untuk melengkapi temuan *molecular docking* serta mengidentifikasi elemen struktural yang berperan penting dalam interaksi ligan-protein pada sisi aktif protease NS2B/NS3. Melalui pendekatan ini, fitur-fitur spasial utama—seperti donor dan akseptor ikatan hidrogen serta cincin aromatik—dapat dipetakan secara sistematis, sehingga memberikan gambaran mengenai kontribusinya terhadap stabilitas kompleks ligan-reseptor. Dengan demikian, model

pharmacophore menyediakan sudut pandang tambahan dalam mengevaluasi kesesuaian kimiawi dan geometrik ligan terhadap target protein.

Model *pharmacophore* dimanfaatkan terutama untuk tujuan eksploratif dan komparatif guna menilai konsistensi fitur interaksi kunci yang diperoleh dari hasil docking. Oleh karena itu, interpretasi difokuskan pada pengenalan pola fitur yang mendukung potensi pengikatan ligan, bukan sebagai model prediktif yang berdiri sendiri. Analisis *pharmacophore* mengidentifikasi fitur-fitur penting untuk aktivitas biologis. Hydrogen-bond donor & acceptor (F3): gugus hidroksi yang berperan sebagai donor dan akseptor hidrogen. Hydrogen-bond acceptor (F2): gugus karbonil yang berperan sebagai akseptor. Cincin aromatik (F1): gugus benzena untuk interaksi π - π

Fitur *pharmacophore* ditunjukkan pada gambar 3. Untuk senyawa 6 dan 9, jarak antar fitur menunjukkan jarak anatara F2 dengan F1: 3.50 Å, F2 dengan F3: 2.80 Å dan F3 dengan F1: 3.50 Å. Jarak yang optimal antar fitur *pharmacophore* mendukung interaksi yang stabil dengan protein target dan dapat dijadikan template untuk desain obat baru.



Gambar 3. Fitur-Fitur Query Pharmacophore Kontrol Positif (a) Senyawa Flavonol 6 (b), dan Senyawa Flavonol 9 (c)

Keterangan : Warna ungu (F3) *Hydrogen-bond donor & acceptor* ; Warna biru (F2): *Hydrogen-bond acceptor* dan Warna orange (F1): *Cincin aromatic*

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi senyawa flavonol 6 dan senyawa flavonol 9 sebagai kandidat potensial inhibitor virus dengue berdasarkan analisis *network pharmacology* dan molecular docking. Kedua senyawa menunjukkan afinitas ikatan yang kuat terhadap NS2B/NS3 protease dengan energi bebas ikatan -6.186 kcal/mol dan -6.855 kcal/mol, nilai RMSD 1.3653 dan 1.2384, serta kecocokan 13 asam amino dengan kontrol positif panduratin A.

Referensi

1. WHO 2024. *Dengue And Severe Dengue*. Geneva, Swiss. World Health Organization.
2. Tomar, R., Bisht, D. & Goel, V. 2019. Co-Circulation Of Dengue Serotypes In A Tertiary Care Hospital In NCR Region. *Journal of Current Microbiology And Applied Sciences*, 8(01): 1307–1313.
3. Rajapakse, S., Silva, N.L. De, Weeratunga, P., Rodrigo, C., Sigera, C. & Fernando, S.D. 2019. Carica Papaya Extract In Dengue: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 19(1): 1–8.
4. Dewi, B.E., Taufiqurrachman, I., Desti, H., Sudiro, M., Fithriyah & Angelina, M. 2020. Inhibition Mechanism of Psidium Guajava Leaf to Dengue Virus Replication In Vitro. *IOP Conference Series: Earth And Environmental Science*, 462(1): 1–4.
5. Starvaggi, J., Previti, S., Zappalà, M. & Ettari, R. 2024. The Inhibition of NS2B/NS3 Protease: A New Therapeutic Opportunity to Treat Dengue And Zika Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8): 1–22.
6. Zhang, R., Zhu, X., Bai, H. & Ning, K. 2019. Network Pharmacology Databases for Traditional Chinese Medicine: Review and Assessment *Science and Technology*, 10(2): 1–14.
7. Rahman, M. A., Shorobi, F.M., Uddin, M. N., Saha, S., Hossain, M. A. 2022. Quercetin Attenuates Viral Infections by Interacting with Target Proteins and Linked Genes in Chemicobiological Models. *In Silico Pharmacol.* 10 (17): 1-12
8. Wivedi V.D., Bharadwaj, S., Afroz, S., Khan, N., Ansari, M. A., Yadava, U., Tripathi, R. C., Tripathi, I. P., Mishra, S. K., Kang, S. G. 2021. Anti-Dengue Infectivity Evaluation of Bioflavonoid from *Azadirachta indica* by Dengue Virus Serine Protease Inhibition. *Journal of Biomolecular Structure Dynamic*. Mar; 39(4):1417-1430.
9. Fatriansyah, J. F., Raihan, K. R., Yandi, Muhammad, Y. A. 2022. Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation of Fisetin, Galangin, Hesperetin, Hesperidin, Myricetin, and Naringenin against Polymerase of Dengue Virus, *Journal of Tropical Medicine*, Mar 20: 7254990.
10. Shimu, M. S. S., Mahmud, S., Tallei, T. E., Sami, S. A., Adam, A. A., Acharjee, U. K., Paul, G. K., Emran, T. B., Zaman, S., Uddin, M. S., Saleh, M. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Alruwali, M., Obaidullah, A. J., Jui, N. R., Kim J, Kim B. 2022. Phytochemical Compound Screening to Identify Novel Small Molecules against Dengue Virus: A Docking and Dynamics Study. *Molecules*. Jan 20;27(3):653.
11. Dass, K., Prakash, N., Manogar, P., & Murugesan, R. 2024. Current insights and future perspectives of In silico molecular docking in Dengue Virus Proteins Inhibition: A review. *Aspects of Molecular Medicine*.
12. Lipinski, C.A. 2000. Drug-Like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability.

- Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1): 235–249.
13. Nyambo, K., Tapfuma, K.I., Adu-Amankwaah, F., Julius, L., Baatjes, L., Niang, I. S., Smith, L., Govender, K. K., Ngxande, M., Watson, D. J., Wiesner, L., Mavumengwana, V. 2024. Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations and Binding Free Energy Studies of Interactions Between *Mycobacterium Tuberculosis* Pks13, PknG and Bioactive Constituents of Extremophilic Bacteria. *Scientific Report*, 14: 6794
 14. Pires, D.E.V., Blundell, T.L. & Ascher, D.B. 2015. PkcsM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9): 4066–4072.
 15. Shofi, M. 2022. Studi In Silico Senyawa Kuarsetin Daun Kencana Ungu (*Ruellia Tuberosa* L.) Sebagai Agen Antikanker Payudara. *Jurnal Sintesis: Penelitian Sains, Terapan dan Analisisnya*, 2(1): 1–9.
 16. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. 2019. Swisstargetprediction : Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules. *Nucleic Acids Research*, 47(5): 357–364.
 17. Hamzah, N., Haeria & Paewa, K.D. 2015. Studi Farmakofor dan Docking Molekul Reseptor $\Sigma 2$ Sebagai Target Pengobatan Kanker Payudara. *Jurnal Farmasi Universitas Negeri Islam Alauddin*, 3(1): 11–16.
 18. Frimayanti, N., Lukman, A. & Nathania, L. 2021. Studi Molecular Docking Senyawa 1,5-Benzothiazepine Sebagai Inhibitor Dengue DEN-2 NS2B/NS3 Serine Protease. *Chempublish Journal*, 6(1): 54–62. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M. & Medina-Franco, J. L. 2018. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes Y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21: 65–87.
 19. Muttaqin, F. Z. & Hubbi Nasrullah, M. 2019. Studi Molecular Docking, Molecular Dynamic, dan Prediksi Toksisitas Senyawa Turunan Alkaloid Naftiridin Sebagai Inhibitor Protein Kasein Kinase 2-A Pada Kanker Leukemia. *Pharmacoscript*, 2(1): 49–64.
 20. Aryani, H., Akbar, N. F., Kurniatin, P. A., Fuad, A. M. & Ambarsari, L. 2016. Optimization of PCR Conditions for Adding XhoI Restriction Sites to The Glucose Oxidase Gene of *Aspergillus Niger* IPBCC 08.610. *Current Biochemistry*, 11(1): 14–23.
 21. Rohmah, M. K. 2017. Studi In Silico Kompleks Ligand-Reseptor Eugenol Daun Basil (*Ocimum Basilicum* L.) dengan Reseptor Her2 Pada Non-Small Cell Lung Cancer (NscLc) Dengan Kontrol Gefitinib. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 3(2): 71–78.
 22. Siswandono 2016. *Kimia Medisinal Edisi II*. Surabaya: Airlangga University Press.
 23. Syahputra, G., Ambarsari, L. & Sumaryada, T. 2014. Simulasi Docking Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*, 10(1): 55–67
 24. Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S.P., Yin, Z., Keller, T.H., Vasudevan, S.G. & Hommel, U. 2006. Structural Basis for the Activation Of Flaviviral NS3 Proteases From Dengue And West Nile Virus. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(4): 372–373.
 25. Jung, S. W., Kim, M., Ramsey, S.,

Kurtzman, T. & Cho, A.E. 2018. Water Pharmacophore: Designing Ligands Using Molecular Dynamics Simulations with Water. *Scientific Reports*, 8(1): 1–11.