

**ANALISIS *IN SILICO* INHIBISI ENZIM SITOKROM P450 3A4
OLEH SENYAWA GOLONGAN INHIBITOR HIV-PROTEASE
DENGAN TEKNIK *MOLECULAR DOCKING***

AGUS SETIAWAN

0305050035



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2009**

**ANALISIS *IN SILICO* INHIBISI ENZIM SITOKROM P450 3A4
OLEH SENYAWA GOLONGAN INHIBITOR HIV-PROTEASE
DENGAN TEKNIK *MOLECULAR DOCKING***

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

AGUS SETIAWAN

0305050035



DEPOK

2009

SKRIPSI : ANALISIS *IN SILICO* INHIBISI ENZIM SITOKROM P450 3A4
OLEH SENYAWA GOLONGAN INHIBITOR HIV-PROTEASE
DENGAN TEKNIK *MOLECULAR DOCKING*

NAMA : AGUS SETIAWAN

NPM : 0305050035

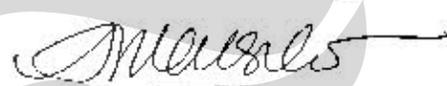
SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009



Dr. Arry Yanuar, Apt., MSi.

PEMBIMBING I



Dr. Amarila Malik, Apt., MSi.

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana: 10-7-2009

Penguji I : Dr. Harmita, Apt.

Penguji II : Dr. Berna Elya, MSi.

Penguji III : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, MS., PhD.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa dan TriRatna (Buddha, Dhamma, dan Sangha) karena atas berkat, rahmat dan perlindungan-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penulis menyadari adanya bantuan dan bimbingan yang sangat berarti dari berbagai pihak dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, Apt., MSi., selaku Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, saran, bantuan, dukungan, dan solusi terhadap berbagai permasalahan yang dihadapi selama penelitian.
2. Ibu Dr. Amarila Malik, Apt., MSi., selaku Pembimbing II dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran bantuan, dan dukungan selama penulis menjalani perkuliahan hingga penelitian.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi, FMIPA, UI, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Zhou Shu Feng dari *Division of Chinese Medicine, RMIT University*, Victoria, Australia, dan Ibu Janne T. Backman dari *Department of Clinical Pharmacology, University of Helsinki*,

Helsinki, Finlandia, yang telah bersedia memberikan jurnal penelitian yang diminta oleh penulis.

5. Bapak Charles David Stout dari Scripps yang telah memberikan solusi terhadap permasalahan yang dihadapi saat penelitian.
6. Seluruh staf pengajar serta karyawan Departemen Farmasi, FMIPA, UI, atas bantuannya selama penulis menimba ilmu.
7. Mama dan papa tersayang, kedua kakak, dan adikku yang selalu memberikan dukungan, doa, semangat, saran dan bantuan.
8. Ko Riswanto yang telah membantu dalam penelusuran literatur.
9. Chatarina (BoCa), Frans, Panya, Fileas, Sherly, Lia, Yuhendi, Isabela (Gobel), Kak Luci, Kak Rendy, Ventry, Wahyu, Ami, Achil, dan seluruh teman angkatan 2005 Farmasi UI, terutama teman-teman KBI Kimia Farmasi, serta teman KMBUI yang telah memberikan bantuan dan semangat dalam melaksanakan penelitian.
10. Semua pihak, yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis juga menyadari adanya kekurangan yang terdapat pada skripsi ini, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang farmasi, dan kebahagiaan semua makhluk.

Penulis

2009

ABSTRAK

Sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) terlibat dalam 50% metabolisme dari obat-obatan yang digunakan dalam terapi. Saat ini, struktur CYP3A4 telah diperoleh melalui teknik kristalografi dan struktur ini menunjukkan bahwa CYP3A4 memiliki situs aktif yang fleksibel sehingga memberikan berbagai kemungkinan interaksi dengan ligan. Inhibitor HIV-Protease merupakan salah satu golongan senyawa yang menghambat aktivitas CYP3A4. Interaksi inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease perlu diteliti lebih lanjut karena golongan senyawa ini sering digunakan bersama obat-obatan lain dalam terapi HIV dan masih terus dikembangkan. Metode *in silico* melalui teknik penambatan molekuler digunakan dalam penelitian ini untuk mempelajari inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease karena metode ini lebih efisien daripada metode *in vitro* dan *in vivo*. Hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4 menunjukkan bahwa empat interaksi hidrofobik dan sedikitnya satu ikatan hidrogen terlibat dalam inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease.

Kata kunci : CYP3A4, *in silico*, inhibisi, inhibitor HIV-Protease, penambatan molekuler

xii + 120 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi : 61 (1994-2009)

ABSTRACT

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) contributes to the metabolism of 50% of drugs used in therapy. Nowadays, the structures of CYP3A4 are available through crystallography technique and these structures show that CYP3A4 has a flexible active site which allows many probabilities of ligand interaction. HIV-Protease inhibitor is a group of drugs that inhibit CYP3A4's activity. Inhibition of CYP3A4 by HIV-Protease inhibitor should be studied more because these drugs are often used with other drugs in the therapy of HIV and are still being developed. *In silico* method through molecular docking is used in this research to study the inhibition of CYP3A4 by HIV-Protease inhibitor because this method is more efficient than *in vitro* and *in vivo* method. The result of molecular docking of HIV-Protease inhibitor to CYP3A4 shows that four hydrophobic interactions and at least one hydrogen bond are responsible for the inhibition of CYP3A4 by HIV-Protease inhibitor.

Keywords : CYP3A4, HIV-Protease inhibitor, *in silico*, inhibition, molecular docking

xii + 120 pages; fig.; tab.; app.

Bibliography : 61 (1994-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Protein.....	5
B. Enzim.....	8
C. Sitokrom P450.....	9
D. Sitokrom P450 3A4.....	13
E. Inhibitor Sitokrom P450 3A4.....	14
F. Inhibitor HIV-Protease.....	16
G. Bioinformatika.....	19
H. <i>Computational Chemistry</i> atau Kimia Komputasi	20
I. <i>Molecular Docking</i> atau Penambatan Molekuler.....	23

J. Protein Data Bank.....	26
K. PyMOL.....	27
L. ClustalW2.....	27
M. CCP4 – SuperPose.....	28
N. Vega ZZ.....	29
O. Cygwin.....	30
P. AutoDock4.....	30
Q. LIGPLOT.....	32
BAB III ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA	
A. Alat.....	33
B. Bahan.....	33
C. Cara Kerja	
1. Pencarian sekuens dan struktur tiga dimensi dari CYP3A4 serta struktur tiga dimensi dari metirapon dan inhibitor HIV-Protease.....	33
2. Pemilihan struktur tiga dimensi dari CYP3A4.....	34
3. Optimasi struktur tiga dimensi CYP3A4 untuk penambatan molekuler	34
4. Pemisahan dan optimasi metirapon dari CYP3A4.....	35
5. Pemisahan, pemilihan dan optimasi struktur tiga dimensi inhibitor HIV-Protease untuk penambatan molekuler.....	35
6. Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 untuk penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4.....	36
7. Visualisasi dan analisis hasil penambatan molekuler metirapon.....	37

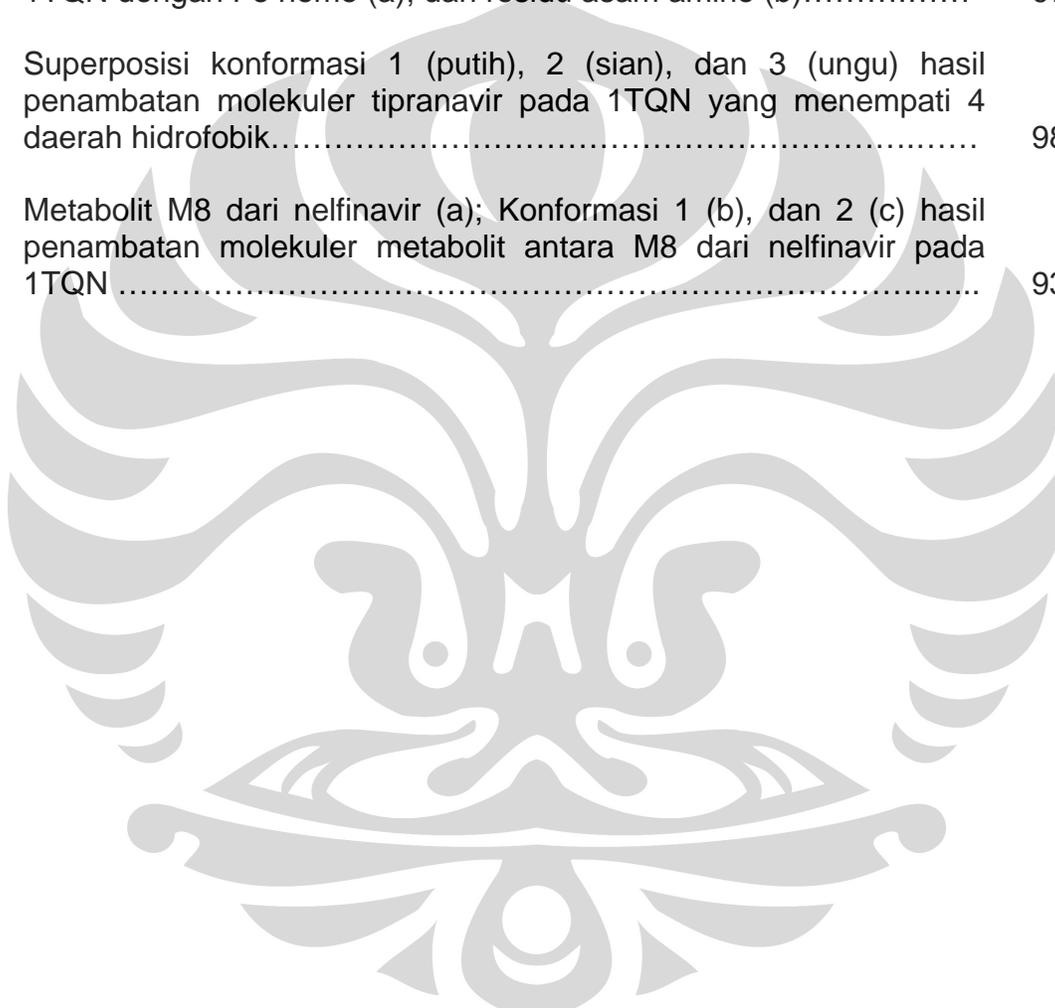
8. Penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4.....	37
9. Analisis hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil	
1. Pencarian sekuens dan struktur tiga dimensi dari CYP3A4 serta struktur tiga dimensi dari metirapon dan inhibitor HIV-Protease.....	39
2. Pemilihan struktur tiga dimensi dari CYP3A4.....	39
3. Optimasi struktur tiga dimensi CYP3A4 untuk penambatan molekuler.....	40
4. Pemisahan dan optimasi metirapon dari CYP3A4.....	41
5. Pemisahan, pemilihan dan optimasi struktur tiga dimensi inhibitor HIV-Protease untuk penambatan molekuler.....	42
6. Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 untuk penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4.....	43
7. Visualisasi dan analisis hasil penambatan molekuler metirapon.....	43
8. Penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4.....	44
9. Analisis hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease.....	45
B. Pembahasan.....	46
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan.....	61
B. Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. 20 jenis asam amino penyusun protein.....	69
2. Mekanisme siklus katalitik oleh sitokrom P450.....	70
3. Struktur umum sitokrom P450 dengan SRS berwarna hitam.....	70
4. Struktur sitokrom P450 3A4 (1TQN).....	71
5. Siklus hidup HIV dan peran inhibitor HIV Protease dalam memutus siklus hidup HIV.....	72
6. Struktur sepuluh inhibitor HIV-Protease yang disetujui penggunaannya dalam klinik oleh FDA hingga Desember 2008.....	73
7. Hasil superposisi 1W0E ke 1TQN.....	75
8. Hasil superposisi 1W0F ke 1TQN.....	75
9. Hasil superposisi 1W0G ke 1TQN.....	76
10. Hasil superposisi 2J0D rantai A ke 1TQN.....	76
11. Hasil superposisi 2V0M rantai A ke 1TQN.....	77
12. Gugus heme pada 1TQN.....	78
13. Gugus heme pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi.....	78
14. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara <i>steepest descent</i> dan dilanjutkan <i>conjugate gradient</i>	79
15. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara <i>trust</i>	79
16. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara <i>trust</i> dengan mempertahankan konformasi gugus heme.....	80
17. Posisi metirapon terhadap heme pada 1W0G.....	80

18.	Hasil optimasi ligan untuk penambatan molekuler pada 1TQN.....	81
19.	Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi	82
20.	Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi <i>trust</i>	83
21.	Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi <i>trust</i> dan mempertahankan gugus heme ...	84
22.	Situs aktif sitokrom P450 3A4 (1TQN): rantai samping residu yang berperan dalam warna ungu (a); empat daerah hidrofobik (b).....	85
23.	Histogram hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); dan 2 (c) hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN	86
24.	Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	87
25.	Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	88
26.	Superposisi konformasi 1 (putih) dan 2 (sian) hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik	89
27.	Histogram hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); dan 2 (c) hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN	90
28.	Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	91
29.	Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	92
30.	Superposisi konformasi 1 (putih) dan 2 (sian) hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik	93
31.	Histogram hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); 2 (c); dan 3 (d) hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN	94

32. Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	95
33. Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	96
34. Interaksi konformasi 3 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b).....	97
35. Superposisi konformasi 1 (putih), 2 (sian), dan 3 (ungu) hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik.....	98
36. Metabolit M8 dari nelfinavir (a); Konformasi 1 (b), dan 2 (c) hasil penambatan molekuler metabolit antara M8 dari nelfinavir pada 1TQN	93



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kondisi dan kualitas CYP3A4 yang terdapat pada PDB.....	101
2. Jumlah <i>Gasteiger Charges</i> yang ditambahkan dan jumlah torsi fleksibel inhibitor HIV-Protease pada proses optimasi ligan.....	101
3. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi.....	102
4. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode <i>trust</i>	104
5. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode <i>trust</i> tetapi dengan mempertahankan gugus heme.....	105
6. Data <i>cluster</i> dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN.....	106
7. Data <i>cluster</i> dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN.....	107
8. Data <i>cluster</i> dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN.....	108

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Urutan tahap cara kerja penelitian.....	109
2. Skema cara kerja penelitian.....	111
3. Perintah LINUX yang digunakan pada penelitian ini.....	112
4. Hasil penyejajaran sekuens enam CYP3A4 pada PDB.....	113
5. Tampilan situs <i>Protein Data Bank</i> (PDB) dan ClustalW2.....	116
6. Tampilan program PyMOL.....	117
7. Tampilan program CCP4, Edit PDB file, dan SuperPose.....	118
8. Tampilan program Vega ZZ.....	119
9. Tampilan program AutoDock Tools (ADT).....	120

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Sitokrom P450 adalah enzim utama yang berperan dalam metabolisme sebagian besar obat, yaitu sekitar 75% metabolisme obat melibatkan enzim ini (1). Dari 57 isoform sitokrom P450 yang terdapat dalam tubuh manusia, isoform 3A4 (CYP3A4) terlibat dalam sekitar 50% metabolisme obat-obatan yang digunakan dalam terapi (2). Hal ini menjadikan enzim CYP3A4 sebagai enzim yang paling banyak terlibat dalam interaksi obat yang tidak diinginkan dalam klinik (3). Saat ini, struktur kristal CYP3A4 telah berhasil diperoleh, baik dalam keadaan bebas maupun terikat bersama ligan. Berdasarkan struktur kristal tersebut, enzim CYP3A4 memiliki celah situs aktif yang besar dan fleksibel. Situs aktif yang besar dan fleksibel dari enzim ini serta jenis substrat dengan beragam struktur molekul menyebabkan adanya berbagai kemungkinan interaksi antara CYP3A4 dengan substratnya (1). Kemungkinan ini menjadi semakin kompleks karena CYP3A4 mampu mengikat lebih dari satu molekul ligan secara simultan (3).

Interaksi antara CYP3A4 dengan berbagai molekul, baik substrat maupun inhibitorynya, sangat penting untuk diketahui dengan baik karena interaksi ini dapat menjelaskan berbagai proses yang terkait dengan efikasi, metabolisme, serta toksisitas dari berbagai obat dan karsinogen (1). Interaksi

ini juga penting untuk memprediksi kemungkinan terjadinya interaksi obat akibat perubahan aktivitas enzim, terutama yang dikarenakan inhibisi enzim (1). Inhibisi enzim perlu diperhatikan karena perubahan aktivitas enzim pada tingkat molekuler umumnya merupakan inhibisi enzim dan inhibisi CYP3A4 dapat menimbulkan interaksi obat, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan secara klinik.

Salah satu golongan senyawa yang memiliki potensi besar dalam menginhibisi CYP3A4 adalah senyawa golongan inhibitor HIV-Protease (15). Interaksi inhibisi antara CYP3A4 oleh senyawa golongan inhibitor HIV-Protease perlu diketahui dengan lebih baik karena adanya penerapan polifarmasi dalam terapi HIV untuk mengatasi infeksi oportunistik dan efek samping yang terjadi (23), padahal polifarmasi dengan senyawa golongan inhibitor HIV-Protease memiliki kecenderungan yang kuat untuk menyebabkan terjadinya interaksi obat melalui inhibisi CYP3A4. Proses pengembangan obat (*drug development*) pada inhibitor HIV-Protease (19) juga menyebabkan interaksi inhibisi ini penting untuk dipahami karena faktor yang berperan penting dalam terminasi suatu kandidat obat pada pengembangan obat adalah faktor toksisitas dan interaksi obat yang mungkin ditimbulkan kandidat obat tersebut, terutama melalui penghambatan enzim metabolisme seperti CYP3A4. Pemahaman terhadap interaksi inhibisi pada CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease diharapkan dapat membantu pengembangan inhibitor HIV-Protease yang tidak menghambat aktivitas CYP3A4 sehingga mengurangi potensi terjadinya interaksi obat.

Interaksi antara enzim CYP3A4 dengan berbagai molekul, termasuk inhibitor HIV-Protease, dapat diteliti melalui berbagai metode yang meliputi penelitian *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico*. Penelitian *in silico* terhadap interaksi protein dengan ligan, dalam hal ini CYP3A4 dengan inhibitor HIV-Protease, menyebabkan proses penelitian menjadi lebih efisien jika dibandingkan dengan penelitian *in vivo* dan *in vitro*. Metode *in silico* yang dapat digunakan untuk menganalisis interaksi antara CYP3A4 dengan inhibitornya adalah proses *molecular docking* atau penambatan molekuler.

Saat ini, berbagai perangkat lunak penambatan molekuler telah dikembangkan, misalnya Arguslab, AutoDock, DOCK, FlexX, Gold, dan lain-lain. Pada penelitian ini, perangkat lunak yang dipilih untuk melakukan proses penambatan molekuler adalah AutoDock karena Autodock merupakan perangkat lunak yang ekonomis dan dapat melakukan proses *docking* atau penambatan ligan pada makromolekul dengan akurat. AutoDock juga merupakan perangkat lunak yang paling banyak digunakan dalam penambatan molekuler (48).

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh protokol *molecular docking* untuk enzim sitokrom P450 3A4 dengan menggunakan program AutoDock.
2. Menganalisis interaksi inhibisi sitokrom P450 3A4 oleh senyawa inhibitor HIV-Protease.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. PROTEIN

Protein adalah polimer linier yang terbentuk dengan menghubungkan gugus α -karboksil dari suatu asam amino dengan gugus α -amino dari asam amino lain melalui suatu ikatan peptida (disebut juga ikatan amida). Sejumlah asam amino yang terhubung oleh ikatan peptida akan membentuk rantai polipeptida dan setiap unit asam amino pada suatu polipeptida disebut sebagai residu. Rantai polipeptida yang terdiri atas 50 sampai 2000 residu asam amino ini dikenal sebagai protein (9). Struktur 20 macam asam amino penyusun protein terdapat pada Gambar 1.

Variasi struktur dari protein menunjukkan peran protein yang kompleks dan beragam dalam sistem biologi. Berdasarkan keseluruhan karakteristik dari strukturnya, protein dapat dibedakan menjadi protein globular dan protein fibrosa. Protein globular bersifat kompak dengan bentuk yang tampak sferik atau *ovoid* dan memiliki rasio aksial (perbandingan antara dimensi panjang dan lebar) tidak lebih dari 3, sedangkan protein fibrosa memiliki struktur memanjang dengan rasio aksial lebih dari 10 (7). Berdasarkan fungsi biologinya, protein dapat diklasifikasikan sebagai protein struktural yang bertanggung jawab terhadap bentuk dan stabilitas dari sel dan jaringan (kolagen), enzim yang berfungsi mengkatalisis berbagai reaksi biokimia

(dehidrogenase), protein penyimpanan (ferritin), protein pengatur (hormon peptida), protein pelindung (imunoglobulin), protein pengangkut (hemoglobin), dan protein kontraktil/motil (aktin) (6,8). Empat tingkat susunan pada struktur protein, yaitu:

1. Struktur Primer

Struktur primer rantai polipeptida sebuah protein adalah susunan atau urutan asam-asam amino yang terhubung oleh ikatan peptida membentuk rantai polipeptida (9). Susunan ini juga mencakup lokasi setiap ikatan disulfida yang terbentuk.

2. Struktur Sekunder

Struktur sekunder merupakan hasil pelipatan rantai polipeptida membentuk struktur tertentu, yaitu heliks α , β sheet, serta *turns and loops* (9). Konformasi pada struktur sekunder ini distabilkan oleh interaksi non-kovalen, antara lain: ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi elektrostatik, dan interaksi van der Waals. Struktur heliks α terbentuk jika tulang punggung sebuah polipeptida terpelin dengan jumlah yang sama di setiap karbon α . Struktur heliks α umumnya memiliki putaran ke kanan, sedangkan heliks α dengan putaran ke kiri jarang ditemukan. Akan tetapi, heliks kolagen memiliki putaran ke kiri dengan struktur heliks yang lebih renggang (8). Struktur β sheet terbentuk jika gugus karbon α serta gugus rantai samping yang berkaitan terletak silih berganti antara sedikit di atas dan sedikit di bawah

terhadap bidang utama rantai polipeptida (6). Struktur β sheet disebut antiparalel jika kedua rantai polipeptida pada struktur tersebut memiliki arah yang berlawanan dan disebut paralel jika memiliki arah yang sama (8). *Turns* merupakan bagian yang terdiri atas 4 residu asam amino dan tersusun sedemikian rupa sehingga rantai polipeptida menekuk 180° atau berbalik arah (8). *Loop* terdiri atas asam amino yang tersusun tidak teratur, tetapi ukuran dan bentuknya yang bervariasi akan membentuk sifat permukaan yang utama pada protein (6).

3. Struktur Tersier

Struktur tersier mengacu pada keseluruhan konformasi tiga dimensi dari suatu polipeptida. Struktur tersier menggambarkan posisi struktur sekunder (*heliks*, *sheet*, *turn*, dan *loop*) dalam membentuk suatu domain dan hubungan antara domain-domain yang terbentuk. Domain adalah bagian dari struktur protein yang dapat melakukan aktivitas tertentu secara fisika atau kimia, misalnya pengikatan ligan (7).

4. Struktur Kuartener

Protein dapat terdiri atas satu rantai polipeptida (protein monomerik), dua rantai polipeptida (protein dimerik), atau lebih. Struktur kuartener terbentuk jika rantai-rantai polipeptida saling berkaitan membentuk struktur multisubunit dari suatu protein atau protein oligomerik (9). Struktur kuartener menggambarkan komposisi rantai polipeptida dari protein oligomerik dan

hubungan spasial antara subunit-subunit protein tersebut. Rantai polipeptida penyusun protein oligomerik dapat berupa rantai yang sama (homo) atau berbeda (hetero) (7).

B. ENZIM

Enzim adalah suatu katalis biologi atau substansi biologi yang dapat mempercepat reaksi kimia (8). Berdasarkan mekanisme reaksi yang dikatalisis, *the International Union of Biochemistry* (IUB) telah menetapkan suatu sistem penamaan enzim. Nama enzim terdiri atas dua bagian, nama pertama menunjukkan substrat dan nama kedua menunjukkan tipe reaksi yang dikatalisis serta diikuti akhiran *-ase*. Informasi tambahan dapat diberikan pada bagian akhir dalam tanda kurung. Setiap enzim juga memiliki nomor kode dari *Enzyme Commission* (EC). Penomoran enzim terdiri atas 4 digit angka dengan digit pertama menunjukkan kelas, digit kedua menunjukkan subkelas, digit ketiga menunjukkan subsubkelas, dan digit keempat menunjukkan spesifitas (6). Berdasarkan spesifitas reaksi dan substrat, enzim dikelompokkan ke dalam enam kelas, yaitu oksidoreduktase (kelas I), transferase (kelas II), hidrolase (kelas III), liase atau sintase (kelas IV), isomerase (kelas V), dan ligase atau sintetase (kelas VI) (8).

Sebagian besar enzim merupakan protein, tetapi ada pula molekul RNA yang bersifat katalitik dan dikenal sebagai ribozim. Beberapa enzim memiliki molekul kecil non-protein atau ion logam yang berpartisipasi dalam pengikatan substrat atau katalisis reaksi. Komponen ini disebut gugus

prostetik, kofaktor dan koenzim. Gugus prostetik adalah molekul atau ion logam yang terinkorporasi dalam struktur protein dengan kuat dan stabil melalui ikatan kovalen atau non-kovalen. Kofaktor mempunyai fungsi yang serupa dengan gugus prostetik tetapi kofaktor terikat secara sementara pada enzim atau substrat. Koenzim berfungsi sebagai pengangkut yang memindahkan, bahkan menstabilkan substrat dari tempat substrat tersebut dihasilkan hingga tempat substrat tersebut digunakan (7).

Jenis dan jumlah substrat dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik berupa peningkatan aktivitas (induksi enzim) maupun penurunan aktivitas enzim (inhibisi enzim). Induksi enzim terjadi akibat peningkatan produksi enzim sedangkan inhibisi enzim terjadi akibat pengikatan molekul lain baik secara kompetitif maupun non-kompetitif (10). Inhibitor kompetitif dan non-kompetitif dibedakan berdasarkan faktor kinetika. Inhibitor kompetitif memiliki situs aktif yang sama dengan substrat dan peningkatan konsentrasi substrat akan mengurangi pengaruh inhibisi sedangkan inhibitor non-kompetitif memiliki situs aktif yang berbeda dengan substrat dan peningkatan konsentrasi substrat tidak akan berpengaruh pada proses inhibisi (7). Inhibitor enzim juga dapat bersifat reversibel jika inhibisi tidak bersifat permanen dan ireversibel jika inhibisi bersifat permanen (8).

C. SITOKROM P450

Sitokrom P450 merupakan enzim monooksigenase yang utama dalam retikulum endoplasma. Sitokrom P450 ditemukan dalam berbagai sistem

kehidupan, mulai dari bakteri hingga manusia (12). Enzim ini diberikan simbol nama P450 karena ditemukan ketika preparat mikrosom yang telah mengalami reduksi kimiawi dan kemudian terpajan karbon monoksida memperlihatkan suatu puncak yang khas pada panjang gelombang 450 nm (6). Sitokrom P450 juga merupakan superfamili dari suatu hemoprotein atau enzim (protein) yang mengandung heme (4). Protein heme memiliki fungsi dalam pengikatan oksigen, pengangkutan oksigen, dan fotosintesis (6).

Sitokrom P450 berperan penting pada metabolisme berbagai zat, baik senyawa endogen maupun eksogen, termasuk xenobiotik (4). Pada metabolisme obat, sitokrom P450 terlibat dalam 75% metabolisme obat, yaitu pada tahap metabolisme fase I. Reaksi yang dikatalisis oleh sitokrom P450 adalah hidroksilasi, heteroatom oksigenasi, heteroatom dealkilasi, pembentukan epoksida, dan perpindahan suatu gugusan. Reaksi-reaksi ini terjadi karena sitokrom P450 mengkatalisis reaksi oksidasi substrat oleh molekul oksigen (O_2). Mekanisme katalisis ini secara umum diawali oleh pengikatan substrat pada sitokrom P450. Pengikatan substrat akan menyebabkan perubahan posisi molekul air sebagai ligan ion Fe sehingga terjadi perubahan tingkat spin dan potensial reduksi ion Fe. Perubahan potensial reduksi ini menyebabkan ion Fe akan tereduksi oleh NADPH dan reaksi ini dikatalisis oleh enzim NADPH-P450 reduktase. Setelah itu, ion Fe yang tereduksi akan mengikat molekul oksigen (12). Sitokrom P450 akan memecah molekul oksigen yang terikat lalu mereduksi satu atom oksigen untuk membentuk molekul air (H_2O) dengan ion H^+ dan menginkorporasikan

satu atom oksigen yang lain pada substrat, yaitu pada ikatan C-H, sehingga membentuk gugus hidroksil (Gambar 2) (5).

Penelitian mengenai enzim sitokrom diawali dari studi terhadap metabolisme steroid, obat-obatan, dan senyawa karsinogen pada tahun 1940-an, dan pada saat ini, gen yang mengkodekan enzim sitokrom telah diketahui, bahkan berbagai struktur kristal dengan resolusi tinggi dari sitokrom P450 manusia telah diperoleh (1). Berdasarkan *Human Genome Project* yang telah lengkap, manusia memiliki 57 gen yang mengkodekan enzim sitokrom (1). Hal ini berarti manusia memiliki 57 isoform enzim sitokrom P450. Penamaan untuk membedakan setiap jenis isoform enzim sitokrom dilakukan berdasarkan homologi struktural. Simbol akar CYP digunakan untuk menyatakan sitokrom P450. Simbol ini diikuti oleh bilangan Arab yang menyatakan famili, lalu diikuti huruf besar yang menunjukkan subfamili, dan diakhiri oleh angka Arab untuk menyatakan urutan anggota dalam subfamili. Sitokrom P450 dinyatakan dalam satu famili jika memperlihatkan persamaan identitas rangkaian minimal 40% dan dinyatakan dalam satu subfamili jika memperlihatkan persamaan identitas rangkaian minimal 55% (6). Saat ini, berbagai penelitian menunjukkan adanya polimorfisme pada enzim sitokrom P450 karena adanya perbedaan alel gen yang mengkodekan enzim sitokrom P450, oleh karena itu penamaan enzim sitokrom P450 dapat disertai tanda bintang (*) yang diikuti dengan angka Arab yang menunjukkan alel pada polimorfisme. Subfamili 3A dari enzim

sitokrom P450 terdiri atas 4 isoform, yaitu CYP3A4, CYP3A5, CYP 3A7, dan CYP3A43 (15).

Berbagai struktur sitokrom P450 memiliki topologi dan lipatan struktur yang serupa meskipun hanya memiliki kesamaan identitas sekuens kurang dari 20% pada tingkat superfamili. *Structurally Conserved Region* (SCR) atau daerah yang tetap pada struktur sitokrom P450 terbentuk oleh empat buah heliks yaitu heliks D, E, I, dan L. Gugus prostetik heme pada sitokrom P450 dibatasi oleh ujung heliks I dan L serta terikat dengan gugus sistein pada loop yang memiliki sekuens penanda sitokrom P450, yaitu FxxG(H/R)xCxG. Bagian tengah dari heliks I yang menjadi dinding pembatas gugus heme juga memiliki sekuens penanda sitokrom P450 dengan pola sekuens (A/G)Gx(E/D)T. Gugus treonin pada bagian ini merupakan bagian yang *highly conserved* dan terlibat pada proses katalisis oleh sitokrom P450 (18).

Meskipun pola lipatan berbagai struktur sitokrom P450 serupa, keragaman struktur yang ada menyebabkan adanya perbedaan jenis dan ukuran substrat dari setiap isoform sitokrom P450. Proses pengikatan substrat pada sitokrom P450 dapat terjadi melalui enam *Substrate Recognition Sites* (SRS) atau situs pengenalan substrat. Keenam SRS pada sitokrom P450 antara lain daerah heliks B' (SRS1), bagian dari heliks F dan G (SRS2 dan SRS3), bagian dari heliks I (SRS4), daerah penghubung heliks K dan $\beta 2$ (SRS6), dan daerah $\beta 4$ (SRS5) (Gambar 3). Daerah SRS ini dikenal sebagai daerah yang fleksibel dan akan mengalami perubahan posisi pada pengikatan substrat melalui mekanisme *induced-fit* (18).

D. SITOKROM P450 3A4

Isoform sitokrom P450 3A4 (CYP3A4), yang pada awalnya dikenal sebagai nifedipin oksidase, merupakan katalis primer dari reaksi hidroksilasi-6 β pada testosteron dan juga terlibat dalam 50% metabolisme dari obat-obatan yang digunakan dalam terapi. CYP3A4 juga merupakan protein integral pada membran yang berinteraksi atau terikat dengan membran melalui ujung N-heliks dan beberapa bagian hidrofobik, yaitu heliks F' dan G' (14). Nath, et al, menunjukkan bahwa kondisi membran dapat mempengaruhi pengikatan ligan pada enzim CYP3A4 (11). Enzim ini diekspresikan dalam jumlah besar pada organ hati dan ditemukan juga dalam kadar rendah pada beberapa jaringan ekstrahepatik (4). Ekspresi yang besar pada hati menjadikan CYP3A4 sebagai sitokrom terbanyak dalam tubuh manusia.

Gen yang mengkodekan CYP3A4 terletak pada kromosom 7 q21 .3-22.1, dan terdiri atas 27.592 pasangan basa yang memiliki bagian pengkode dengan 13 ekson. Bagian promotor dari gen ini meliputi *basal transcription element*, *AP-3 binding site*, *p53 binding motif*, *hepatocyte nuclear factor-4* (HNF-4), dua buah *hepatocyte nuclear factor-5* (HNF-5), *glucocorticoid response element* (GRE), *pregnane X receptor element* (PXRE), dan *estrogen response element*. Hasil transkripsi gen yang dilanjutkan dengan translasi menghasilkan protein yang tersusun atas sejumlah kompleks heliks dan *sheet*, serta terdiri atas 502 asam amino dengan berat 57,29 kDa. Hal ini menjadikan CYP3A4 sebagai sitokrom terbesar dalam tubuh manusia (15).

Saat ini, struktur molekul enzim CYP3A4 telah berhasil diperoleh melalui teknik kristalografi sinar-X (Gambar 4). Struktur ini menunjukkan bahwa CYP3A4 memiliki celah situs aktif yang sangat besar, terutama pada daerah yang dekat dengan ion Fe pada heme, serta adanya sisi pengikatan substrat yang lebih dari satu sehingga enzim ini mampu mengoksidasi molekul yang besar seperti siklosporin, statin, taxan, dan antibiotik makrolida. Selain itu, situs aktif yang besar juga mampu menjelaskan karakteristik kinetika enzim ini yang tidak umum (non-linear). Hal ini dikarenakan situs aktif yang besar menyebabkan enzim ini dapat terikat dengan lebih dari satu molekul substrat yang kecil secara simultan. Kemampuan CYP3A4 dalam berinteraksi dengan berbagai molekul yang berbeda ukuran dan strukturnya terbukti dengan adanya fleksibilitas struktur dari enzim ini, yaitu pada heliks F-G. Struktur kristal CYP3A4 juga diperoleh dalam bentuk terikat dengan progesteron, metirapon, eritromisin, dan ketokonazol (14). Dari keempat senyawa tersebut, progesteron yang merupakan substrat dari CYP3A4, terikat pada daerah perifer, sedangkan eritromisin, metirapon dan ketokonazol yang merupakan inhibitor dari CYP3A4, terikat pada situs aktif dekat dengan heme (14,16).

E. INHIBITOR SITOKROM P450 3A4

Inhibitor CYP3A4 adalah senyawa, termasuk obat, yang dapat mengganggu atau mengurangi kemampuan CYP3A4 dalam memetabolisme suatu substrat. Berdasarkan afinitasnya, inhibitor enzim dapat dibedakan ke

dalam dua kelas, yaitu reversibel dan ireversibel. Inhibitor yang bersifat reversibel dapat dibedakan lagi menjadi inhibitor kompetitif, non-kompetitif, dan campuran. Inhibitor ireversibel atau *mechanism-based inhibitor* memegang peranan penting dalam penggunaan obat yang rasional dalam terapi karena inhibisi ini sangat mempengaruhi profil farmakokinetika (*clearance*) suatu obat. Saat ini, beberapa *mechanism-based inhibitor* dari CYP3A4 yang telah diketahui dan memiliki peran penting pada penggunaan di dalam klinik meliputi (15):

- a. Anti-HIV, contohnya ritonavir, delavirdin dan nelfinavir
- b. Antibiotik golongan makrolida, contohnya eritromisin, klaritromisin.
- c. Antidepresan, seperti fluoksetin dan fluvoxamin
- d. Senyawa bloker kanal kalsium, seperti verapamil dan diltiazem
- e. Steroid dan modulatornya, seperti gestoden dan mifepriston, dan
- f. Beberapa bahan herbal, seperti bergamotin dalam *grapefruit juice*.

Inhibitor CYP3A4 juga sering dibedakan berdasarkan potensi penghambatannya terhadap aktivitas enzim (13). Inhibitor poten dari CYP3A4 meliputi inhibitor HIV-Protease (ritonavir, nelfinavir), antibiotik golongan makrolida (eritromisin, klaritromisin, troleandomisin), dan antifungi (ketokonazol, itrakonazol), sedangkan inhibitor yang kurang poten meliputi saquinavir, flukonazol, fluoksetin, kotrimazol, dan bergamotin (1).

Inhibisi CYP3A4 dapat memberikan pengaruh negatif dan positif terhadap penggunaan obat dalam klinik. Pengaruh negatif timbul jika inhibisi CYP3A4 menyebabkan terjadinya toksisitas atau interaksi obat yang

dimetabolisme oleh CYP3A4, misalnya penggunaan inhibitor poten CYP3A4 dengan ergotamin dapat menyebabkan iskemik serebral dan perifer, bahkan pada beberapa kasus terjadi kematian dan amputasi. Pengaruh positif diperoleh jika inhibisi CYP3A4 diinginkan untuk mengurangi laju metabolisme obat, misalnya jika obat yang dimetabolisme sangat mahal seperti siklosporin (5), atau untuk meningkatkan efektivitas obat lain, misalnya ritonavir dapat meningkatkan efektivitas antikanker docetaxel sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya resistensi (17).

F. INHIBITOR HIV-PROTEASE

HIV-Protease merupakan salah satu enzim yang dimiliki oleh virus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan termasuk dalam kelas *aspartic protease* karena memiliki residu asam aspartat, yang memiliki fungsi katalitik dengan bantuan molekul air, pada situs aktifnya. Pada siklus hidup HIV, enzim HIV-Protease berperan dalam memotong prekursor poliprotein virus menjadi protein struktural dan fungsional dari virus. Suatu studi penelitian telah menunjukkan bahwa partikel virus dengan enzim protease yang inaktif tidak mampu berkembang menjadi bentuk yang infeksius. Peran yang penting dari enzim HIV-protease pada siklus hidup HIV menyebabkan enzim ini menjadi salah satu target dalam terapi infeksi HIV (Gambar 5) (19).

Inhibitor HIV-Protease dikembangkan melalui skrining senyawa penuntun dari senyawa-senyawa alamiah yang dioptimasi atau secara empiris berdasarkan substrat protease yang diketahui. Inhibitor protease

yang efektif sebagai obat harus memiliki karakter peptida yang minimal, stabilitas yang tinggi terhadap degradasi proteolitik secara non-selektif, permeabilitas membran yang baik, selektif terhadap protease tertentu, tidak mudah tereliminasi, dan bioavailabilitas yang baik. Sifat dan karakter tersebut umumnya dipenuhi oleh senyawa dengan berat molekul yang rendah, kurang dari 1000 Da. Berdasarkan hal tersebut, *substrate-based drug design* dilakukan terhadap senyawa peptida yang terdiri atas kurang dari 10 asam amino, hasil pemotongan substrat polipeptida yang diketahui dari *aspartic protease*, dengan mengganti ikatan amida yang mudah terbelah dengan isoster yang tidak dapat terbelah dan melakukan optimasi potensi inhibisi terhadap HIV-Protease melalui modifikasi struktur (20). Struktur inti yang digunakan adalah gugus hidrosietilen dan hidrosietilamin yang tidak dapat terhidrolisis, atau isoster lain seperti statin, norstatin, fosfinat, amida tereduksi, dihidrosietilen, α -keto amida, serta senyawa yang mengandung silikon. Isoster-isoster tersebut umumnya memiliki gugus hidroksi pada bagian tengah struktur yang berfungsi meniru kondisi transisi pada degradasi proteolitik oleh *aspartic protease* melalui ikatan dengan residu katalitik Asp-25 dan Asp-25' dari HIV-Protease (19). Struktur inti dari isoster ini dilengkapi dengan rantai samping yang bersifat hidrofob agar struktur inhibitor yang diperoleh dapat berikatan kuat dengan daerah situs aktif HIV-Protease yang bersifat hidrofob.

Saquinavir, yang dikembangkan oleh Hoffmann-La Roche dan memiliki isoster hidrosietilamin, merupakan inhibitor HIV-Protease pertama

yang disetujui penggunaannya oleh FDA pada tahun 1995. Nelfinavir, yang dikembangkan oleh Lilly dan Agouron dan disetujui oleh FDA pada tahun 1997, dan amprenavir, yang dikembangkan oleh Vertex dan disetujui oleh FDA pada tahun 1999, juga memiliki isoster hidroksietilamin. Pada tahun 1996, FDA menyetujui penggunaan indinavir yang dikembangkan oleh Merck dan memiliki isoster hidroksietilen. Abbott Laboratories berhasil mengembangkan isoster (S,S,S)-aminoalkohol pada ritonavir, yang disetujui FDA pada tahun 1996, dan lopinavir, yang disetujui FDA pada tahun 2000 (19). Hingga akhir Desember 2008, ada 10 inhibitor HIV-Protease yang telah disetujui penggunaannya dalam klinik oleh United States Food and Drug Administration (US FDA), termasuk fosamprenavir, atazanavir, tipranavir, dan darunavir (Gambar 6) (21).

Meskipun berbagai obat antiretroviral, termasuk golongan inhibitor HIV-Protease telah tersedia secara komersial, efektivitas pengobatan HIV terhambat oleh adanya resistensi yang timbul selama pengobatan. Resistensi ini disebabkan laju replikasi virus yang tinggi dan enzim *HIV-reverse transcriptase* yang memiliki tingkat kesalahan yang tinggi dalam melakukan transkripsi balik. Untuk mengatasi masalah resistensi, berbagai jenis obat antiretroviral golongan inhibitor HIV-Protease terus dikembangkan dan berbagai kombinasi terapi antiretroviral, yang dikenal dengan HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), telah diterapkan (19,20).

Senyawa golongan inhibitor HIV-Protease umumnya mengalami metabolisme oleh sitokrom P450, terutama isoform 3A4, menjadi

metabolitnya. Beberapa inhibitor HIV-Protease dan metabolitnya, kecuali tipranavir, memiliki kemampuan menghambat CYP3A4 dengan kuat (22,23). Akan tetapi, mekanisme penghambatan atau inhibisi CYP3A4 oleh beberapa inhibitor HIV-Protease dan metabolitnya yang reaktif masih belum diketahui dengan jelas (15). Dalam mengatasi infeksi oportunistik, gangguan psikis, dan efek samping antiretroviral, terapi HIV juga umumnya menerapkan polifarmasi dengan berbagai jenis obat, seperti antidepresan, antipsikotik, hipnotik-sedatif, antibiotik, dan antifungi, serta dengan antibiotik golongan makrolida, antifungi golongan imidazol, dan sesama inhibitor HIV-Protease (pada HAART) yang juga memiliki potensi penghambatan terhadap CYP3A4 (24). Potensi penghambatan CYP3A4 dan penerapan polifarmasi pada terapi HIV menyebabkan penggunaan inhibitor HIV-Protease dapat menimbulkan interaksi obat yang bermakna secara klinis karena peningkatan paparan obat terhadap tubuh hingga tingkat yang menimbulkan toksisitas.

G. BIOINFORMATIKA

Bioinformatika merupakan kajian ilmu yang memadukan disiplin ilmu biologi molekuler, matematika dan teknologi informasi. Bioinformatika dapat didefinisikan sebagai aplikasi atau penggunaan alat dan metode komputasi (metode *in silico*) yang bertujuan untuk menangani data atau informasi biologi molekuler. Sebagai bidang ilmu yang interdisipliner, bioinformatika terkait dengan beberapa cabang ilmu lain, seperti Biofisika, Biologi Komputasi,

Biologi Matematis, *Medical Informatics*, *Chemoinformatics*, Genomik, Proteomik, Farmakogenomik, dan Farmakogenetik (25).

Aplikasi metode bioinformatika meliputi penyejajaran sekuens, pencarian database, analisis filogenetik, pengenalan motif, prediksi struktur RNA dan protein, prediksi gen, analisis protomer, analisis transkriptom, analisis proteom, dan modeling dari sistem biologi yang kompleks (26). Dalam bidang pengobatan, bioinformatika bermanfaat dalam mengelola data-data klinis pasien melalui *Electrical Medical Record* (EMR), mengidentifikasi atau mendiagnosis penyakit baru melalui analisis genom dan sekuens, serta menemukan obat baru melalui teknik *molecular docking* (25).

H. COMPUTATIONAL CHEMISTRY ATAU KIMIA KOMPUTASI

Kimia komputasi melakukan simulasi terhadap struktur dan reaksi kimia secara numerik, berdasarkan hukum-hukum fisika yang fundamental. Perhitungan pada kimia komputasi didasari oleh persamaan Schrödinger yang memberikan deskripsi lengkap mengenai struktur elektronik dari molekul. Jenis persamaan yang digunakan dalam kimia komputasi untuk menghitung kondisi energi dari suatu molekul terdiri atas model *ab initio*, semi-empiris, dan mekanika molekuler (27).

1. Struktur tiga dimensi dari molekul (28)

Prinsip yang digunakan dalam membentuk konformasi tiga dimensi suatu struktur dari suatu representasi molekul, antara lain metode *force-field*

dan *knowledge-based*. Metode *force-field*, yang didasari pada mekanika molekuler, memperlakukan molekul sebagai objek mekanika, misalnya atom merupakan sferik umum yang dihubungkan oleh “pegas”, dan interaksi antar-atom ditentukan oleh suatu energi potensial. Energi potensial ini merupakan penjumlahan dari *stretching energy* (energi yang memperkirakan vibrasi ikatan dan bergantung pada jarak antar-atom), *bending energy* (energi yang bergantung pada sudut antara dua ikatan), *torsion energy* (energi yang memperhitungkan momen gaya yang dihasilkan oleh putaran sudut dihedral yang dibentuk 4 atom), dan *non-bonded interaction energy* (jumlah dari interaksi elektrostatik dan gaya van der Waals dari atom-atom yang tidak saling berikatan). Metode *knowledge-based* menghitung energi interaksi dalam molekul dengan melakukan investigasi terhadap konformasi molekul dengan energi rendah yang diketahui. Data interaksi molekul yang diperoleh secara eksperimen dianalisis secara statistik untuk menentukan parameter molekuler. Hasil analisis data secara statistik ini kemudian digunakan untuk menyusun persamaan atau fungsi energi potensial molekul.

2. Interaksi Ligan-Reseptor (28)

Secara termodinamika, interaksi ligan-reseptor dapat terjadi apabila kompleks ligan-reseptor yang dihasilkan memiliki energi yang lebih rendah. Perubahan energi bebas (ΔG) yang menyertai interaksi ligan-reseptor didefinisikan melalui persamaan Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Berdasarkan persamaan tersebut, perubahan energi bebas dipengaruhi oleh perubahan entalpi (ΔH) dan perubahan entropi (ΔS). Perubahan entalpi mengacu pada gaya molekuler yang terlibat dalam interaksi ligan-reseptor, seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik (polar), interaksi aromatik, dan interaksi van der Waals, sedangkan perubahan entropi terkait dengan perubahan derajat bebas dari suatu sistem molekuler. Tanda negatif untuk perubahan entropi menunjukkan bahwa interaksi ligan-reseptor cenderung disertai peningkatan entropi. Penurunan derajat bebas molekul ligan dan reseptor pada saat berinteraksi menyebabkan penurunan entropi, tetapi penurunan entropi ini dikompensasi oleh peningkatan entropi yang disebabkan peningkatan derajat bebas molekul air yang terlepas dari permukaan ligan dan reseptor pada saat ligan dan reseptor berinteraksi.

Konstanta disosiasi (K_d), atau lebih dikenal sebagai konstanta inhibisi (K_i), dari suatu ligan terhadap suatu makromolekul umumnya ditentukan melalui *biochemical competition assays*. Konstanta inhibisi (K_i) ini diperkirakan dari konstanta disosiasi ligan referensi (K_d^{ref}) dan konsentrasi ligan yang diperlukan untuk menyebabkan 50% ligan referensi terlepas dari ikatannya dengan makromolekul (IC_{50}) melalui persamaan Cheng-Prusoff:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Ligan\ ref]}{K_d^{ref}}}$$

Interaksi ligan-reseptor untuk tujuan *modeling* umumnya membedakan jenis-jenis interaksi ke dalam beberapa kategori seperti elektrostatik, van der Waals, ikatan hidrogen, lipofilik, aromatik, dan polar. Ikatan hidrogen yang

terjadi antara protein dengan ligan umumnya memiliki jarak rata-rata 3 Å dan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk tidak menunjukkan korelasi langsung dengan nilai K_i karena adanya perbedaan kekuatan ikatan hidrogen yang bergantung pada jenis atom yang berinteraksi dan geometri ikatan hidrogen. Interaksi kation dengan muatan parsial negatif dikenal dengan interaksi kation- π dan interaksi ini umumnya terjadi antara kation dan elektron π yang terdelokalisasi pada cincin aromatik. Cincin aromatik umumnya memiliki muatan parsial negatif pada daerah tengah cincin dan muatan parsial positif pada tepi cincin sehingga dua cincin aromatik dapat berinteraksi melalui interaksi aromatik. Gugus alifatik juga dapat membentuk interaksi hidrofobik dan jarak interaksi dari interaksi hidrofobik dapat mencapai 6 Å. Interaksi hidrofobik merupakan jenis interaksi yang penting untuk pengikatan inhibitor tetapi tidak terlalu berperan dalam pengenalan ligan secara selektif.

I. **MOLECULAR DOCKING ATAU PENAMBATAN MOLEKULER**

Molecular docking merupakan suatu metode terkomputerisasi yang digunakan untuk menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein (39). Reseptor atau target pada proses *docking* dapat diperoleh dari hasil eksperimen atau hasil homologi modeling (30). *Molecular docking* sebagai salah satu metodologi dalam *structure-based virtual screening*, dimulai pada awal tahun 1980-an. Secara umum, tujuan dari studi *docking* adalah pemodelan struktur yang akurat dan prediksi aktivitas yang tepat.

Pada proses *docking*, molekul-molekul yang terlibat dapat dianggap sebagai atom-atom, permukaan, atau *grid* yang mewakili molekul tersebut. Proses *docking* terdiri atas beberapa tahap yang kompleks. Proses ini diawali dengan penerapan *docking algorithm* yang memposisikan ligan pada situs aktif dengan konformasi tertentu dan urutan pencarian konformasi tertentu, kemudian *scoring function* yang melengkapi *docking algorithm* akan mengevaluasi konformasi dengan melakukan perhitungan berdasarkan sifat fisikokimia untuk memperoleh struktur molekul yang optimal (31). Berdasarkan proses tersebut, suatu program *molecular docking* merupakan kombinasi dari *docking algorithm* dan *scoring function* (39).

1. *Docking Algorithm* (31)

Metode pencarian konformasi atau *docking algorithm* dapat dibedakan ke dalam tiga kategori, yaitu metode sistematis, metode acak atau stokastik, dan metode simulasi. Metode sistematis mengeksplorasi semua derajat bebas pada molekul untuk menentukan konformasi yang tepat, misalnya dengan menentukan posisi fragmen-fragmen ligan pada situs aktif lalu menghubungkan fragmen-fragmen tersebut secara kovalen atau menentukan dahulu posisi inti yang rigid baru menentukan posisi ligan yang fleksibel. Metode acak atau stokastik melakukan perubahan posisi ligan secara acak untuk menentukan konformasi yang tepat, contohnya metode pencarian *Monte Carlo* dan *genetic algorithm*. Metode simulasi menggunakan proses simulasi seperti dinamika molekuler untuk menentukan konformasi yang

tepat, tetapi metode ini jarang digunakan sebagai metode pencarian tunggal karena metode ini hanya mampu melakukan pencarian lokal.

Genetic Algorithm atau Algoritme genetika (32,33,34)

Algoritme genetika diperkenalkan oleh Holland dan termasuk dalam metode pencarian acak atau stokastik untuk optimisasi global. Algoritme ini meniru metode adaptasi terhadap perubahan lingkungan pada proses evolusi. Setiap individu dalam populasi pada suatu generasi dapat dianggap sebagai kromosom, tetapi materi genetik ini merupakan simbol-simbol linear atau angka yang mewakili suatu unit struktural. Manipulasi materi genetik dalam proses evolusi ini dilakukan melalui proses seleksi, *crossover*, dan mutasi. Seleksi merupakan proses pemilihan oleh metode *integer-decimal*. *Crossover* merupakan analog dari reproduksi seksual yang meliputi dua tahap, yaitu pemilihan dua individu sebagai *parents* dari populasi yang ada dan pemotongan materi genetik *parents* secara acak lalu memasangkannya secara silang. Mutasi merupakan perubahan secara acak terhadap kode materi genetik beberapa individu dalam populasi dengan probabilitas tertentu. Evaluasi oleh *scoring function* terhadap setiap generasi terus dilakukan dengan mempertahankan hasil yang baik dan mengeliminasi hasil yang kurang baik hingga diperoleh hasil yang konvergen.

2. Scoring Function (31)

Saat ini terdapat tiga tipe *scoring function* yang diaplikasikan pada program *docking*, yaitu *scoring function* berdasarkan *force field*, empiris, dan

berdasarkan *knowledge*. *Scoring function* berdasarkan *force field* menyatakan energi sistem sebagai jumlah dari berbagai mekanika molekuler. Mekanika molekuler umumnya merupakan jumlah dari dua jenis energi yaitu energi interaksi ligan dengan reseptor dan energi internal ligan. *Scoring function* empiris didasari pada ide bahwa energi ikatan dapat diperkirakan dari jumlah parameter-parameter tertentu. Koefisien untuk setiap parameter ditentukan berdasarkan analisis regresi terhadap energi ikatan yang diperoleh secara eksperimen. *Scoring function* berdasarkan *knowledge* lebih mementingkan struktur yang pernah diperoleh melalui eksperimen daripada energi ikatan sehingga pengaruh pengikatan ligan dievaluasi secara implisit.

J. PROTEIN DATA BANK

Protein Data Bank (PDB) merupakan arsip tunggal, yang meliputi seluruh dunia, yang mengumpulkan data mengenai struktur tiga dimensi dari senyawa makromolekul biologis (35). Data struktur tiga dimensi pada PDB diperoleh secara eksperimen, terutama melalui teknik kristalografi sinar X, resonansi magnet inti (*Nuclear Magnetic Resonance/ NMR*), dan mikroskopi *cyro-electron*. Model teoritis juga terdapat dalam PDB tetapi hanya dapat diakses melalui arsip ftp (*file transfer protocol*) untuk membedakannya dengan data hasil eksperimen (36). Data struktur tiga dimensi yang terdapat dalam PDB terus bertambah dengan pesat, mulai dari 7 struktur pada tahun 1971 hingga lebih dari 18,800 molekul pada Oktober 2002 (37). PDB dioperasikan oleh *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

(RCSB) dan dapat diakses secara bebas melalui <http://www.pdb.org>, situs ftp (<ftp://ftp.rcsb.org>) dan sejumlah situs lainnya (35).

K. PYMOL (38)

PyMOL adalah suatu perangkat lunak *modeling* dan visualisasi yang dikembangkan untuk memvisualisasikan berbagai konformasi dari suatu struktur, menjadi tampilan dari program eksternal, menyediakan kekuatan grafis yang baik, menyediakan gambar yang berkualitas untuk publikasi, dan ekonomis. Kelebihan dari PyMOL yaitu dapat digunakan pada berbagai sistem operasi, menggunakan perintah dalam bahasa yang umum, dapat melakukan pemilihan atom, pemotongan dan penyambungan molekul serta mengubah konformasi, mempunyai berbagai jenis tampilan untuk visualisasi dengan efek tertentu, dan program ini dapat terus dikembangkan. Akan tetapi, PyMOL juga memiliki kekurangan, yaitu tidak mudah digunakan bagi pengguna yang baru dan hanya memiliki dokumentasi beberapa waktu terakhir. Program PyMOL diciptakan oleh Warren Lyford DeLano, diterbitkan pada Desember 1999, dan dapat diunduh melalui situs <http://www.pymol.org>.

L. CLUSTALW2

ClustalW2 adalah suatu program *multiple sequence alignment* (39) yang digunakan untuk melakukan *alignment* (penyejajaran) sekuens, baik sekuens asam nukleat maupun sekuens protein. *Multiple sequence alignment* merupakan suatu metode dalam komputerisasi biologi yang dilakukan untuk

memperoleh gambaran mengenai bagian-bagian homolog antara protein-protein yang berada dalam satu famili dan untuk mengetahui residu-residu fungsional yang dapat menjelaskan sejarah evolusi dari famili-famili pada protein (39,40). *Alignment* pada ClustalW2 didasari pada sistem perhitungan yang rumit dengan penyesuaian parameter terhadap karakter sekuens yang diproses, seperti panjang sekuens dan divergensi (40). Program Clustal pertama kali ditulis oleh Des Higgins pada tahun 1988, dan terus dikembangkan menjadi ClustalV, ClustalX, hingga akhirnya ClustalW dirilis untuk pertama kali pada tahun 1994. Walaupun pada awalnya program ini hanya dikembangkan untuk komputer lokal, saat ini program ClustalW2 tersedia pada beberapa situs, terutama pada situs EBI (*European Bioinformatics Institute*), yaitu <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2> (41).

M. CCP4 - SUPERPOSE

CCP4 (*Collaborative Computational Project number 4*) adalah sekumpulan program dan data terasosiasi yang dapat digunakan untuk penentuan struktur makromolekul dari kristalografi sinar X. Program ini didesain agar bersifat fleksibel sehingga menyediakan berbagai metode kepada pengguna untuk mencapai tujuan mereka. Program-program dalam CCP4 berasal dari sumber yang berbeda tetapi dihubungkan oleh format data standar (42). Program-program yang terdapat dalam CCP4 antara lain: PDBCUR, Matthew COEF, PDB_EXTRACT, REFMAC, MOLREP, SFCHECK, MOSFLM, BP3, SUPERPOSE, CHAINSAW, PIRATE, dan

PDB_MERGE serta beberapa program tambahan lainnya (43). CCP4 didistribusikan melalui ftp anonim dari Laboratorium Daresbury dan telah digunakan secara luas di seluruh dunia.

SuperPose merupakan program penyejajaran struktur berdasarkan struktur sekunder (43). Program ini mampu melakukan kalkulasi superposisi terhadap dua atau lebih struktur protein yang berbeda sekuens, ukuran, atau bentuk. SuperPose juga menyediakan penyejajaran sekuens, penyejajaran struktur, koordinat PDB, dan simpangan deviasi dari molekul-molekul yang mengalami superposisi (44). Dalam melakukan superposisi, program ini membutuhkan dua *file* sebagai input lalu program ini akan mentransformasikan matriks salah satu *file*, yang memiliki koordinat “moving”, kepada *file* yang kedua, yang memiliki koordinat “fixed” (43).

N. VEGA ZZ

Vega ZZ merupakan program *molecular modeling* yang dikembangkan untuk menghubungkan berbagai program dan mempermudah proses pembelajaran dari pemodelan molekuler karena program ini dilengkapi tampilan grafis dan bekerja pada sistem operasi Windows yang lebih umum digunakan. Saat ini, Vega ZZ telah menjadi seperangkat program pemodelan molekuler yang lengkap dan sesuai untuk digunakan pada tingkat penelitian kimia komputasi, seperti *drug design*, optimasi ligan, *homology modeling*, dan kalkulasi QSAR (45). Vega ZZ dilengkapi dengan fitur-fitur seperti tampilan grafis tiga dimensi untuk pengguna, program-program untuk melakukan

editing dan kalkulasi terhadap molekul. Program ini tersedia secara gratis, terutama untuk kegiatan non-profit dan akademik, tetapi memerlukan proses aktivasi yang memberikan akses penggunaan program selama satu tahun dan dapat diaktivasi kembali setelah masa berlakunya habis. Program Vega ZZ dapat diunduh melalui situs <http://users.unimi.it/~ddl/vega/index2.htm> (46).

O. CYGWIN (47)

Cygwin adalah tampilan dan penggunaan komputer yang menyerupai Linux untuk sistem operasi Windows. Cygwin terdiri atas sebuah DLL, yang menyediakan tampilan sistem operasi, dan sejumlah piranti lunak yang menyediakan tampilan dan penggunaan seperti Linux. Meskipun demikian, Cygwin memiliki beberapa perbedaan dengan Linux, misalnya pada *C library* dan *default /bin/sh*. Instalasi Cygwin akan memberikan akses terhadap berbagai kegunaan standar UNIX dan instalasi program-program UNIX tanpa melakukan perubahan yang ekstensif pada *source code*. Cygwin mulai dikembangkan pada tahun 1995 oleh Cygnus Solutions, saat ini merupakan bagian dari *Red Hat Software*, dan dapat diunduh secara gratis melalui <http://cygwin.com>.

P. AUTODOCK4

AutoDock merupakan seperangkat program *docking* otomatis. AutoDock didesain dan dikembangkan untuk menyediakan prosedur dalam memprediksi interaksi antara suatu molekul kecil, misalnya substrat atau

obat, dengan suatu makromolekul atau reseptor yang diketahui struktur tiga dimensinya. AutoDock terdiri atas dua program yaitu, AutoGrid yang digunakan untuk menghitung dan menetapkan batasan ruang *docking*, dan AutoDock yang melaksanakan proses *docking* suatu ligan terhadap target protein dalam batasan ruang yang telah ditetapkan. Sebagai tambahan, Autodock juga telah dilengkapi AutoDock Tools (ADT) yang berfungsi sebagai tampilan grafis yang membantu menganalisis ligan dan proses *docking*. AutoDock tersedia melalui GNU General Public License dan dapat diunduh melalui situs <http://autodock.scripps.edu> (49).

Setiap proses *docking* dengan AutoDock membutuhkan paling sedikit empat input *files*, yaitu PDBQT *file* untuk ligan, PDBQT *file* untuk makromolekul atau reseptor, grid parameter *file* (GPF) untuk perhitungan oleh AutoGrid, dan *docking* parameter *file* (DPF) untuk perhitungan oleh AutoDock. GPF akan memberitahukan AutoGrid reseptor yang perlu dihitung potensialnya, tipe-tipe *map* yang harus dihitung beserta lokasinya. Adapun DPF akan memberitahukan AutoDock *map* yang digunakan, ligan yang digerakkan, termasuk pusat dan torsi dari ligan, *docking algorithm* yang digunakan dan jumlah *docking* yang harus dilakukan. AutoDock memiliki empat *docking algorithm* yang dapat digunakan, yaitu *Simulated Annealing* (SA), *Darwinian Genetic Algorithm* (GA), *Local Search* (LS), dan *Lamarckian Genetic Algorithm* (GA-LS) atau perpaduan GA dengan LS (50).

Sebelum melakukan proses *docking* dengan AutoDock, molekul yang diperoleh dari PDB perlu dikoreksi terlebih dahulu karena adanya beberapa

kekurangan pada molekul-molekul dalam PDB, seperti adanya atom yang hilang, molekul pelarut, molekul yang lebih dari satu, rantai yang terputus, dll. ADT dapat melakukan beberapa koreksi yang harus dilakukan, yaitu penambahan atom hidrogen, penghitungan *Gasteiger Charges*, dan penghilangan hidrogen non-polar. Akan tetapi, tidak semua kekurangan pada molekul dari PDB dapat dikoreksi oleh ADT sehingga diperlukan program lain untuk memeriksa kualitas dari struktur molekul yang digunakan (50).

Q. LIGPLOT (51)

Program LIGPLOT merupakan program yang digunakan untuk menghasilkan representasi dua dimensi dari *input file*, yang berupa *file* PDB dari kompleks protein-ligan, secara otomatis. *Output* dari program ini berupa *PostScript file* yang menunjukkan interaksi intermolekuler, termasuk ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan kemampuan akses terhadap atom. Program ini didesain secara umum untuk berbagai jenis ligan dan untuk memfasilitasi pemeriksaan terhadap berbagai kompleks enzim-ligan, serta dapat menunjukkan berbagai tipe interaksi pada protein dan asam nukleat. Program LIGPLOT dapat diunduh secara gratis untuk keperluan akademik melalui situs <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/ligplot/ligplot.html>.

BAB III

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. ALAT

Komputer dengan spesifikasi RAM minimal satu *gigabyte*, *Dual Core processor*, dan dilengkapi dengan perangkat lunak PyMOL, CCP4, Vega ZZ, Cygwin, dan AutoDock, serta memiliki koneksi internet.

B. BAHAN

1. Sekuens asam amino dan struktur tiga dimensi dari sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) yang diunduh dari Protein Data Bank (PDB) dengan identitas PDB 1TQN, 2J0D, 2V0M, 1W0E, 1W0F dan 1W0G
2. Struktur tiga dimensi dari metirapon dan inhibitor HIV-Protease yang diunduh dari PDB, yaitu: metirapon (1W0G), ritonavir (1RL8), saquinavir (2NMZ), indinavir (2AVO), nelfinavir (2PYN), amprenavir (1T7J), lopinavir (2O4S), atazanavir (2O4K), darunavir (3EBZ), dan tipranavir (2O4L); serta struktur fosamprenavir.

C. CARA KERJA

1. Pencarian sekuens dan struktur tiga dimensi dari CYP3A4 serta struktur tiga dimensi dari metirapon dan inhibitor HIV-Protease

Sekuens dari CYP3A4, serta struktur tiga dimensi dari CYP3A4, metirapon, dan inhibitor HIV-Protease ditelusuri dan diunduh dari PDB.

2. Pemilihan struktur tiga dimensi dari CYP3A4

Data struktur tiga dimensi CYP3A4 dari PDB yang berupa keterangan mengenai kondisi kristal diamati dan ditabulasi. Struktur yang terdiri atas lebih dari satu subunit disejajarkan sekuens asam amino antar-subunitnya terlebih dahulu dengan menggunakan ClustalW2, lalu disuperposisikan dengan menggunakan CCP4 untuk melihat kemiripan dari setiap subunit. Setelah itu, semua struktur tiga dimensi CYP3A4 disejajarkan strukturnya satu sama lain dengan bantuan ClustalW2. Hasil yang diperoleh dianalisis serta dipilih sejumlah struktur yang mewakili CYP3A4. Struktur yang terpilih pada proses penyejajaran sekuens diseleksi dan dipisahkan dari ligan dengan menggunakan perintah LINUX melalui Cygwin serta disuperposisikan menggunakan CCP4. Hasil yang diperoleh dianalisis untuk menentukan struktur dengan kualitas terbaik.

3. Optimasi struktur tiga dimensi CYP3A4 untuk penambatan molekuler

Struktur tiga dimensi CYP3A4 terpilih dioptimasi dengan Vega ZZ, yang meliputi: penghapusan molekul air, penambahan hidrogen, pemberian *force-field Autodock* dan muatan parsial *Gasteiger Charges*, serta penerapan minimisasi. Minimisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah

minimisasi dan dengan metode *steepest descent* sebanyak 100 langkah minimisasi yang dilanjutkan dengan *conjugate gradient* sebanyak 1000 langkah minimisasi.

4. Pemisahan dan optimasi metirapon dari CYP3A4

Metirapon yang merupakan ligan pada CYP3A4 dengan identitas PDB 1W0G dipisahkan dari CYP3A4 dengan menggunakan perintah LINUX melalui Cygwin. Struktur metirapon lalu dioptimasi dengan Vega ZZ, yang meliputi penambahan hidrogen, pemberian *force-field* SP4 dan muatan parsial *Gasteiger Charges*, penerapan minimisasi dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah minimisasi, dan pencarian konformasi terbaik berdasarkan torsi fleksibel yang dimiliki metirapon.

5. Pemisahan, pemilihan dan optimasi struktur tiga dimensi inhibitor HIV-Protease untuk penambatan molekuler

Struktur tiga dimensi inhibitor HIV-Protease yang terdiri atas dua molekul yang berhimpitan dan hanya memiliki satu identitas dalam makromolekul dipisahkan identitasnya agar setiap molekul inhibitor HIV-Protease memiliki identitas masing-masing. Inhibitor HIV-Protease yang masih terdapat sebagai ligan dipisahkan dari protein atau makromolekulnya dengan menggunakan perintah LINUX melalui Cygwin dan disimpan dalam format pdb. Struktur fosamprenavir dibuat melalui program Vega ZZ dari struktur amprenavir. Sebelum dioptimasi, struktur inhibitor HIV-Protease diseleksi dahulu

berdasarkan jumlah torsi fleksibel yang dimiliki. Struktur yang dipilih untuk penambatan molekuler adalah struktur yang memiliki torsi fleksibel kurang dari 10. Struktur terpilih lalu dioptimasi dengan Vega ZZ, yang meliputi penambahan hidrogen, pemberian *force-field* SP4 dan muatan parsial *Gasteiger Charges*, penerapan minimisasi dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah minimisasi, dan pencarian konformasi terbaik berdasarkan torsi fleksibel yang dimiliki.

6. Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 untuk penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4
 - a. Struktur CYP3A4 yang telah dioptimasi dengan metode tertentu dipersiapkan pada AutoDock Tools (ADT), lalu dilakukan penambahan hidrogen, *Gasteiger Charges*, penghilangan hidrogen non-polar, dan disimpan dalam format pdb.
 - b. *File* pdbqt metirapon dibuat dari *file* pdb metirapon melalui ADT.
 - c. *File* pdbqt CYP3A4 dibuat dari *file* pdb CYP3A4 melalui ADT.
 - d. Muatan ion Fe pada CYP3A4 dikoreksi dari 0.0 menjadi +3.0 dengan menggunakan perintah LINUX melalui Cygwin
 - e. *Grid parameter file* (gpf) dipersiapkan melalui ADT yang meliputi, pembuatan *map files* yang disesuaikan terhadap ligan dan penentuan batasan ruang penambatan molekuler (*grid box*) yang memiliki pusat koordinat (X,Y,Z) sekitar: -19.13, -23.97, -13.91 dan volume 60 x 60 x 60 Å.

- f. Program Autogrid4 dijalankan melalui Cygwin untuk mengubah *gpf* menjadi *glg*.
- g. *Docking parameter file* (*dpf*) dipersiapkan melalui ADT. Pembuatan *dpf* meliputi, penentuan *file* *pdbqt* dari makromolekul dan ligan yang akan digunakan, penentuan *docking algorithm* beserta parameternya, dan penentuan parameter penambatan molekuler.
- h. Program AutoDock4 dijalankan melalui Cygwin untuk mengubah *dpf* menjadi *dlg* yang merupakan hasil penambatan molekuler dengan AutoDock. Lakukan proses penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 sebanyak 3 kali.

7. Visualisasi dan analisis hasil penambatan molekuler metirapon

Hasil penambatan molekuler divisualisasi dengan bantuan program ADT, Vega ZZ, dan PyMOL, lalu konformasi hasil penambatan dan data-data pada *dlg file* dianalisis untuk menentukan protokol penambatan molekuler.

8. Penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4

- a. *File* *pdbqt* inhibitor HIV-Protease terpilih dibuat dari *file* *pdb* inhibitor HIV-Protease tersebut melalui ADT.
- b. *File* *pdbqt* CYP3A4 dibuat dari *file* *pdb* CYP3A4 yang memberikan hasil penambatan molekuler terbaik pada penentuan protokol melalui ADT.

- c. Muatan ion Fe pada CYP3A4 dikoreksi dari 0.0 menjadi +3.0 dengan menggunakan perintah LINUX melalui Cygwin
 - d. *Grid parameter file* (gpf) dipersiapkan melalui ADT yang meliputi, pembuatan *map files* yang disesuaikan terhadap ligan dan penentuan *grid box* yang memiliki pusat koordinat (X,Y,Z): -19.13, -23.97, -13.91 dan volume 60 x 60 x 60 Å.
 - e. Program Autogrid4 dijalankan melalui Cygwin untuk mengubah gpf menjadi glg.
 - f. *Docking parameter file* (dpf) dipersiapkan melalui ADT. Pembuatan dpf meliputi, penentuan *file pdbqt* dari makromolekul dan ligan yang akan digunakan, penentuan *docking algorithm* beserta parameternya, dan penentuan parameter penambatan molekuler.
 - g. Program AutoDock4 dijalankan melalui Cygwin untuk mengubah dpf menjadi dlg yang merupakan hasil penambatan molekuler dengan AutoDock. Lakukan penambatan molekuler setiap inhibitor HIV-Protease terpilih pada CYP3A4 sebanyak 3 kali.
9. Analisis hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease
- Hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease divisualisasi dengan bantuan program ADT, Vega ZZ, PyMOL, dan LIGPLOT, lalu konformasi hasil penambatan dan data-data pada *dlg file* dianalisis untuk memprediksi interaksi inhibitor HIV-Protease dengan CYP3A4.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pencarian sekuens dan struktur tiga dimensi sitokrom P450 3A4 (CYP3A4), serta struktur tiga dimensi dari metirapon, dan inhibitor HIV-Protease

Pencarian struktur tiga dimensi dari CYP3A4 pada Protein Data Bank (PDB) memberikan enam buah struktur kristal dengan identitas PDB 1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, dan 2V0M. Struktur metirapon diperoleh sebagai ligan dari CYP3A4 dengan identitas PDB 1W0G. Struktur inhibitor HIV-Protease pada PDB diperoleh sebagai ligan yang terikat pada HIV-Protease dan pada satu kristal umumnya terdapat dua molekul inhibitor HIV-Protease yang terikat secara bersama. Dari sepuluh inhibitor HIV-Protease yang disetujui penggunaannya dalam klinik oleh FDA, hanya sembilan struktur yang terdapat dalam PDB. Struktur inhibitor HIV-Protease yang tidak tersedia dalam PDB yaitu fosamprenavir sehingga struktur fosamprenavir dibuat melalui program vega ZZ.

2. Pemilihan struktur tiga dimensi CYP3A4

Kondisi dan kualitas enam struktur CYP3A4 yang terdapat dalam PDB tercantum pada Tabel 1. Dari keenam struktur tersebut, empat struktur, yakni 1TQN, 1W0E, 1W0F, dan 1W0G terdiri atas satu subunit,

sedangkan 2J0D terdiri atas dua subunit dan 2V0M terdiri atas empat subunit. Hasil penyejajaran sekuens antar-subunit pada 2J0D dan 2V0M menunjukkan kemiripan sekuens asam amino hingga 100%, sedangkan superposisi antar-subunit pada 2J0D dan 2V0M menunjukkan bahwa kedua subunit 2J0D dan keempat subunit 2V0M memiliki struktur yang identik (RMSD = 0.519 untuk 2J0D dan 0.391-0.426 untuk 2V0M).

Hasil penyejajaran sekuens antar-struktur CYP3A4 menunjukkan bahwa kelima struktur CYP3A4 memiliki sekuens asam amino yang sama dan hanya terdapat perbedaan satu asam amino pada 1TQN, yaitu adanya residu leusin sebagai asam amino ketiga (Lampiran 4). Pada superposisi keenam struktur CYP3A4, struktur dengan identitas PDB 1TQN, 1W0E, 1W0F, dan 1W0G memiliki struktur tiga dimensi yang sangat mirip (RMSD = 0.598-0.758), sedangkan 2J0D dan 2V0M memiliki konformasi yang sedikit berbeda, tetapi masih cukup serupa dengan keempat struktur lainnya (RMSD = 0.982-1.524). Berdasarkan analisis kondisi dan kualitas kristal, hasil penyejajaran sekuens dan superposisi enam struktur CYP3A4, struktur CYP3A4 yang digunakan untuk penambatan molekuler adalah 1TQN. Konformasi hasil superposisi 1TQN dengan lima struktur CYP3A4 lainnya dapat dilihat pada Gambar 7-11.

3. Optimasi struktur tiga dimensi CYP3A4 untuk penambatan molekuler

Optimasi struktur tiga dimensi CYP3A4 pada program Vega ZZ telah menghapus molekul air, menambahkan atom hidrogen, *force-field*

AutoDock dan muatan parsial *Gasteiger Charges*. Pada pemberian *Gasteiger Charges*, muatan parsial yang ditambahkan adalah 12.00. Metode minimisasi dengan cara *steepest descent* sebanyak 100 langkah dan diikuti *conjugate gradient* sebanyak 1000 langkah menghasilkan struktur CYP3A4 dengan gugus heme yang bergelombang (Gambar 14). Metode minimisasi *trust* sebanyak 1000 langkah menghasilkan struktur CYP3A4 dengan gugus heme yang lebih mendekati konformasi gugus heme pada kristal, tetapi ion Fe yang terletak di tengah heme tampak tertarik ke bawah (Gambar 15). Hasil optimasi CYP3A4 dengan gugus heme yang mendekati konformasi heme pada kristal diperoleh melalui metode minimisasi dengan cara *trust* tetapi dengan mempertahankan gugus heme (gugus heme disubstitusi dengan gugus heme yang tidak mengalami minimisasi) (Gambar 16).

4. Pemisahan dan optimasi metirapon dari CYP3A4

Pemisahan metirapon dari CYP3A4 dengan identitas PDB 1W0G menghasilkan struktur metirapon yang bebas (tidak terikat pada CYP3A4). Optimasi struktur metirapon telah menambahkan atom hidrogen yang hilang pada struktur metirapon yang diperoleh dari PDB, dan *force field* SP4, tetapi tidak ada muatan parsial *Gasteiger Charges* yang ditambahkan. Proses minimisasi yang dilakukan tidak memperoleh struktur yang konvergen sehingga dilanjutkan dengan pencarian konformasi. Struktur metirapon memiliki tiga buah torsi fleksibel yang

diperhitungkan dalam pencarian konformasi. Konformasi metirapon hasil pencarian konformasi ditunjukkan pada Gambar 18.

5. Pemisahan, pemilihan dan optimasi struktur tiga dimensi inhibitor HIV-Protease untuk penambatan molekuler

Pemisahan dua Inhibitor HIV-Protease yang berhimpitan hanya memisahkan “sekuens penanda” molekul inhibitor HIV-Protease. Pemisahan berikutnya yang dilakukan dengan perintah LINUX barulah menghasilkan struktur inhibitor HIV-Protease bebas. Optimasi struktur inhibitor HIV-Protease pada program Vega ZZ menambahkan atom hidrogen yang hilang dan *force field* SP4 pada semua struktur inhibitor, tetapi muatan parsial *Gasteiger Charges* hanya ditambahkan pada indinavir nelfinavir, dan saquinavir masing-masing sebanyak 1.00, 2.00 dan 1.00. Minimisasi dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah umumnya tidak menghasilkan struktur yang konvergen.

Pencarian konformasi hanya dilakukan terhadap struktur yang memiliki torsi fleksibel kurang dari sepuluh. Dari sembilan struktur yang diperoleh, hanya tiga struktur yang memiliki torsi fleksibel kurang dari sepuluh, yaitu indinavir, nelfinavir, dan tipranavir, dengan jumlah torsi fleksibel masing-masing adalah 8, 9, dan 8. Pencarian konformasi yang dilakukan terhadap ketiga struktur tersebut berlangsung selama sekitar 3 hingga 5 hari untuk setiap struktur. Hasil penambahan muatan parsial dan jumlah torsi fleksibel sepuluh senyawa inhibitor HIV-Protease dapat dilihat pada Tabel

2, sedangkan konformasi terbaik dari indinavir, nelfinavir, dan tipranavir sebagai hasil pencarian konformasi dapat dilihat pada Gambar 18.

6. Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 untuk penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4

Proses penambatan metirapon pada CYP3A4 berlangsung sekitar satu jam dengan jumlah evaluasi algoritme genetika sekitar 250.000 untuk setiap penambatan. Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 menghasilkan seratus konformasi metirapon pada situs aktif CYP3A4 untuk setiap proses penambatan molekuler dan seratus konformasi ini dikelompokkan ke dalam beberapa *cluster* berdasarkan kemiripan posisi dengan toleransi RMSD = 2 Å. Penambatan molekuler metirapon ini dilakukan pada CYP3A4 yang tidak mengalami minimisasi, mengalami minimisasi metode *trust*, dan minimisasi metode *trust* dengan mempertahankan gugus heme sehingga diperoleh tiga data dan setiap data terdiri atas tiga set data karena penambatan molekuler dilakukan triplo. Data hasil penambatan molekuler metirapon tercantum pada Tabel 3-5, sedangkan konformasi yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 19-21.

7. Visualisasi dan analisis hasil penambatan molekuler pada CYP3A4 dan penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4

CYP3A4 yang mengalami minimisasi sebelumnya (Gambar 20 & 21) memberikan konformasi hasil penambatan molekuler metirapon yang

lebih seragam (konvergen) dibandingkan dengan hasil penambatan molekuler pada CYP3A4 yang tidak mengalami minimisasi (Gambar 19). Metode minimisasi *trust* juga memberikan hasil penambatan molekuler dengan konformasi metirapon yang sesuai dengan kristal tetapi dalam jumlah yang kurang signifikan, hanya sekitar tiga konformasi dari seratus konformasi hasil penambatan (Gambar 20).

Penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4 yang mengalami minimisasi dengan cara *trust* tetapi gugus heme-nya tidak diminimisasi ternyata mampu menghasilkan konformasi yang mendekati konformasi metirapon pada kristal dalam jumlah yang lebih banyak, yaitu sekitar tujuh hingga sepuluh konformasi dari seratus penambatan. Konformasi yang diperoleh juga lebih sesuai dengan konformasi metirapon pada kristal jika dibandingkan dengan hasil penambatan pada CYP3A4 yang mengalami minimisasi dengan cara *trust* secara penuh (Gambar 21). Berdasarkan analisis terhadap hasil penambatan molekuler metirapon pada CYP3A4, maka protokol penambatan molekuler CYP3A4 (1TQN) yang digunakan adalah protokol yang melakukan minimisasi dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah minimisasi lalu melakukan substitusi terhadap gugus heme dengan gugus heme yang tidak mengalami minimisasi.

8. Penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4

Proses penambatan inhibitor HIV-Protease (indinavir, nelfinavir, dan tipranavir) masing-masing berlangsung sekitar 10 jam dengan jumlah

evaluasi algoritme genetika sebanyak 2.500.000 untuk setiap penambatan. Penambatan molekuler pada CYP3A4 menghasilkan seratus konformasi pada situs aktif CYP3A4 untuk setiap inhibitor HIV-Protease dan seratus konformasi ini dikelompokkan ke dalam beberapa *cluster* berdasarkan kemiripan posisi dengan toleransi RMSD = 2 Å. Indinavir, nelfinavir, dan tipranavir masing-masing memiliki 2, 2, dan 3 konformasi yang cukup signifikan dan muncul terus pada penambatan berulang. Data hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease dapat dilihat pada Tabel 6-8.

9. Analisis hasil penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4

Hasil penambatan indinavir pada CYP3A4 memberikan hasil yang kurang seragam antar proses penambatan yang dilakukan berulang. Konformasi hasil penambatan juga kurang seragam, terlihat dari pengelompokan konformasi hasil penambatan (*cluster*) yang kurang signifikan (Tabel 6). Konformasi terbaik hasil penambatan indinavir pada CYP3A4 dapat dilihat pada Gambar 23.

Penambatan molekuler nelfinavir pada CYP3A4 memberikan hasil yang lebih baik dari indinavir karena hasil penambatan yang diperoleh cukup seragam antar proses penambatan yang dilakukan berulang. *Cluster* yang dihasilkan juga lebih baik karena adanya kelompok konformasi yang signifikan (*cluster* terbaik), bahkan *cluster* terbaik ini memiliki energi bebas pengikatan terendah, yang merupakan parameter

konformasi atau posisi hasil penambatan terbaik (Tabel 7). Pada setiap hasil penambatan nelfinavir, terdapat dua *cluster* yang signifikan sehingga terdapat dua posisi interaksi nelfinavir dengan CYP3A4 yang diperoleh. Konformasi terbaik hasil penambatan nelfinavir pada CYP3A4 dapat dilihat pada Gambar 27.

Tipranavir tidak memberikan hasil penambatan molekuler yang berarti karena hasil penambatan yang diperoleh tidak seragam antar penambatan yang dilakukan berulang. Pengelompokan hasil penambatan pada setiap proses penambatan juga tidak menghasilkan *cluster* yang signifikan (Tabel 8). Konformasi terbaik hasil penambatan tipranavir pada CYP3A4 dapat dilihat pada Gambar 31.

B. PEMBAHASAN

Penambatan molekuler atau *molecular docking* sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memahami interaksi, misalnya inhibisi, antara berbagai molekul dengan enzim ini. Salah satu kelompok senyawa yang perlu dipahami interaksinya dengan CYP3A4 adalah senyawa golongan inhibitor HIV-Protease karena senyawa golongan ini memiliki potensi penghambatan CYP3A4 yang kuat, padahal inhibitor HIV-Protease umumnya digunakan bersama obat-obat lain (polifarmasi) dan masih mengalami proses pengembangan obat (*drug development*).

Penelitian ini diawali dengan penelusuran sekuens dan struktur tiga dimensi dari CYP3A4 pada *Protein Data Bank* (PDB). Penelusuran struktur tiga dimensi dilakukan pada PDB karena PDB merupakan *database* struktur tiga dimensi dari berbagai protein yang dapat diakses dengan bebas. Penelusuran pada PDB juga dilakukan terhadap struktur inhibitor HIV-Protease yang telah disetujui penggunaannya oleh FDA, tetapi pada PDB hanya terdapat sembilan dari sepuluh struktur yang dicari. *Database* struktur lain yang dapat ditelusuri, seperti PubChem, juga tidak menyediakan struktur fosamprenavir sehingga struktur fosamprenavir diupayakan untuk dibuat melalui program Vega ZZ dengan mengganti gugus hidroksi pada amprenavir dengan gugus fosfat.

PDB memiliki enam struktur CYP3A4, yaitu 1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, dan 2V0M, dengan kondisi dan kualitas kristal yang berbeda. 2J0D dan 2V0M masing-masing memiliki 2 subunit dan 4 subunit. Analisis struktur, penyejajaran sekuens, dan superposisi antar subunit menunjukkan bahwa setiap subunit ini bersifat identik sehingga setiap subunit pada 2J0D atau 2V0M dapat digunakan untuk mewakili CYP3A4 dan pada proses selanjutnya hanya satu subunit dari setiap struktur tersebut yang digunakan dalam analisis bersama 4 struktur CYP3A4 lainnya.

Berdasarkan analisis kondisi kristal, penyejajaran sekuens, dan superposisi terhadap enam struktur CYP3A4 yang diperoleh dari PDB, struktur yang digunakan untuk penambatan molekuler adalah 1TQN karena 1TQN memiliki resolusi kristal terkecil (2.05 Å) dan hanya memiliki satu

daerah hilang atau *disorder*, yaitu pada residu 282-285 yang termasuk dalam *loop* penghubung heliks H-I (Gambar 4). Pada penyejajaran enam sekuens CYP3A4, sekuens 1TQN hanya berbeda 1 residu, yaitu adanya residu leusin sebagai asam amino ketiga dari sekuens 1TQN. Perbedaan ini tidak terlalu signifikan karena hanya berjumlah satu residu dan posisi residu ini terletak pada daerah terminal, sehingga tidak mengganggu situs aktif (Lampiran 4). Hasil superposisi menunjukkan bahwa 1TQN memiliki struktur yang mirip dengan 1W0E, 1W0F, dan 1W0G, sedangkan struktur 2J0D dan 2V0M memiliki RMSD yang cukup besar jika disuperposisikan dengan 1TQN karena kedua struktur CYP3A4 ini mengikat ligan yang besar (eritromisin pada 2J0D dan 2 molekul ketokonazol pada 2V0M) sehingga konformasi strukturnya lebih terbuka, terutama pada heliks F-G (Gambar 10 & 11). Akan tetapi, secara umum hasil superposisi ini menunjukkan bahwa 1TQN memiliki struktur yang cukup mirip dengan kelima struktur CYP3A4 lainnya karena memiliki RMSD hasil superposisi kurang dari 2.

Sebelum dilakukan penambatan molekuler, struktur 1TQN, metirapon, dan inhibitor HIV-Protease yang diperoleh dari PDB perlu mengalami optimasi terlebih dahulu karena adanya beberapa karakter yang dapat mengganggu penambatan molekuler. Optimasi struktur yang harus dilakukan meliputi beberapa langkah dan pada setiap langkah dapat diterapkan metode yang berbeda-beda sehingga diperlukan suatu protokol yang tepat dalam melakukan optimasi agar memperoleh hasil penambatan molekuler yang baik. Metirapon merupakan inhibitor CYP3A4 yang telah terkristalisasi

bersama CYP3A4 dengan identitas PDB 1W0G sehingga konformasi dan posisi Metirapon dalam CYP3A4 dapat digunakan sebagai pembanding dalam menentukan protokol penambatan molekuler CYP3A4 (Gambar 17). Eritromisin dan ketokonazol juga merupakan inhibitor CYP3A4 yang terkristalisasi bersama CYP3A4 (2J0D dan 2V0M), tetapi eritromisin memiliki konformasi yang besar dan torsi fleksibel yang lebih banyak dari metirapon, sedangkan ketokonazol memiliki 2 molekul yang terkristalisasi bersama sehingga kedua inhibitor ini tidak digunakan dalam penentuan protokol penambatan molekuler CYP3A4 (1TQN).

Optimasi yang harus dilakukan pada struktur yang diperoleh dari PDB yaitu penghilangan molekul pelarut, penambahan hidrogen, *force field*, dan muatan parsial, serta minimisasi jika diperlukan. Molekul air sebagai pelarut yang digunakan pada proses kristalografi dan ikut terdeteksi pada struktur kristal harus dihilangkan agar tidak mengganggu proses penambatan molekuler. Atom hidrogen yang hilang pada kristal perlu ditambahkan karena keberadaan atom hidrogen dapat mempengaruhi interaksi molekuler, misalnya melalui ikatan hidrogen. *Force field* dan muatan parsial juga perlu ditambahkan karena *force field* dan muatan parsial diperlukan oleh program penambatan molekuler dalam melakukan perhitungan atau *scoring*.

Force field yang digunakan pada 1TQN adalah *force field* Autodock karena program penambatan molekuler yang digunakan adalah AutoDock4 dan *force field* ini didasari oleh *force field* AMBER yang umum diterapkan pada protein, sedangkan untuk metirapon dan inhibitor HIV-Protease, *force*

field yang digunakan adalah SP4 sesuai dengan *force field* yang direkomendasikan program Vega ZZ untuk ligan. Muatan parsial yang digunakan, baik untuk 1TQN maupun ligan (metirapon dan inhibitor HIV-Protease), adalah *Gasteiger Charges* sesuai dengan muatan parsial yang direkomendasikan oleh program AutoDock4.

Minimisasi pada 1TQN diuji coba dengan 2 metode, yaitu metode *trust* yang direkomendasikan oleh program Vega ZZ dan metode *steepest descent* yang dilanjutkan dengan *conjugate gradient* yang merupakan metode minimisasi yang sering digunakan untuk protein, termasuk CYP3A4. Metode *steepest descent* yang dilanjutkan *conjugate gradient* ternyata menghasilkan gugus heme yang bergelombang (berbeda dengan konformasi heme dalam kristal) (Gambar 14) sehingga hasil minimisasi CYP3A4 dengan metode ini tidak digunakan dalam penambatan molekuler. Metode minimisasi *trust* menghasilkan gugus heme yang lebih rata tetapi ion Fe yang terletak pada bagian tengah inti porfirin heme tertarik ke bawah (Gambar 15) karena adanya interaksi ion Fe dengan gugus S dari residu C442. Untuk mempertahankan konformasi heme, maka minimisasi dilakukan juga dengan cara ketiga, yaitu dengan metode *trust* tetapi gugus heme dipertahankan sama seperti konformasi pada kristal dengan cara mengganti gugus heme yang telah diminimisasi dengan gugus heme dari kristal 1TQN (Gambar 16).

Minimisasi untuk ligan, baik metirapon maupun inhibitor HIV-Protease, dilakukan dengan metode *trust* tetapi proses minimisasi umumnya tidak mampu mencapai struktur yang konvergen sehingga dilanjutkan dengan

pencarian konformasi terbaik berdasarkan torsi fleksibel yang dimiliki oleh ligan. Pada tahap ini, jumlah torsi fleksibel digunakan untuk memilih inhibitor HIV-Protease yang akan digunakan dalam penambatan molekuler karena semakin banyak torsi fleksibel yang dimiliki suatu molekul, maka pencarian konformasi akan semakin lama dan semakin sulit untuk memperoleh hasil penambatan yang baik, meskipun penambatan molekuler dilakukan berulang. Berdasarkan "*Rule of five*", senyawa yang digunakan dalam penambatan molekuler dari sejumlah besar senyawa adalah senyawa dengan berat molekul kurang dari 500, nilai cLogP antara -5 hingga +5, gugus donor ikatan hidrogen kurang dari 5, gugus akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, dan jumlah ikatan yang dapat berotasi (torsi fleksibel) kurang dari 10 (54). Inhibitor HIV-Protease yang memiliki torsi fleksibel kurang dari 10 menurut program Vega ZZ adalah indinavir, nelfinavir, dan tipranavir (Tabel 2) sehingga pencarian konformasi dan penambatan molekuler hanya dilakukan pada ketiga senyawa tersebut.

Penambatan molekuler dengan program AutoDock4 dilakukan dengan bantuan Cygwin karena komputer yang digunakan menggunakan sistem operasi Windows sedangkan program AutoDock4 merupakan program yang bekerja pada sistem operasi LINUX. Komputer yang digunakan memiliki sistem operasi Windows karena sistem operasi ini lebih mudah digunakan dan beberapa program lain yang digunakan dalam penelitian ini, misalnya CCP4 dan Vega ZZ dapat bekerja pada sistem operasi Windows.

Penambatan molekuler pada 1TQN diawali dengan menggunakan metirapon sebagai ligan untuk menentukan protokol penambatan molekuler 1TQN dan penambatan molekuler dilakukan terhadap 1TQN yang tidak mengalami minimisasi, 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode *trust*, dan 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode *trust* tetapi dengan mempertahankan konformasi gugus heme. Proses penambatan molekuler dilakukan dengan program AutoDock4 dan *docking algorithm* yang digunakan adalah *Lamarckian genetic algorithm* karena algoritme ini merupakan perpaduan dari *genetic algorithm* (pencarian optimum global) dan *local search* (pencarian optimum lokal). Parameter penambatan molekuler yang digunakan adalah parameter standar dari program AutoDock, kecuali volume *grid box* diatur menjadi 60 x 60 x 60 Å agar cukup besar bagi ligan untuk mencari posisi terbaik dalam situs aktif 1TQN, jumlah penambatan pada satu proses diperbanyak menjadi 100 agar hasil penambatan lebih mudah dianalisis dan *cluster* yang dihasilkan tampak lebih signifikan, serta jumlah evaluasi oleh *genetic algorithm* pada satu penambatan ditetapkan sebanyak 250.000 karena jumlah evaluasi ini diperlukan oleh *genetic algorithm* untuk memperoleh hasil yang konvergen.

Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang dioptimasi dengan cara yang berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 19-21. Protokol penambatan molekuler dipilih berdasarkan kemiripan posisi metirapon hasil penambatan dengan posisi metirapon pada kristal karena cara ini merupakan salah satu metode untuk menentukan akurasi posisi ligan hasil penambatan

molekuler (52). Selain itu, posisi metirapon pada kristal 1W0G dapat dipercaya karena interaksi antara atom N pada gugus piridin dari metirapon dengan atom Fe pada gugus heme menunjukkan karakteristik yang sesuai dengan ligan tipe II, yaitu ligan yang berinteraksi langsung dengan atom Fe pada gugus heme dan menyebabkan inhibisi CYP3A4 (53). Posisi ligan tipe II yang cenderung menginhibisi CYP3A4 sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa metirapon merupakan inhibitor CYP3A4 (16). Hasil penambatan molekuler yang memberikan posisi metirapon terbaik, berdasarkan perbandingan dengan posisi metirapon dalam kristal 1W0G, adalah penambatan molekuler pada 1TQN yang diminimisasi menggunakan metode *trust* dengan mempertahankan konformasi gugus heme. Meskipun metode ini memberikan hasil terbaik, tetapi posisi hasil penambatan molekuler metirapon yang mendekati posisi pada kristal berada pada peringkat hasil penambatan kedua dan *cluster* kedua (bukan pada peringkat pertama dan *cluster* terbaik) (Gambar 21). Hal ini mungkin disebabkan pengaruh dari rantai samping residu R212 pada 1TQN yang mengarah ke situs aktif sehingga cincin piridin kedua dari metirapon pada *cluster* terbaik tertarik ke arah atas bukan ke arah bawah seperti konformasi metirapon pada kristal. Akan tetapi, konformasi pada *cluster* terbaik yang diperoleh melalui metode ini tetap menunjukkan karakteristik ligan tipe II dari CYP3A4 dan metode ini memberikan hasil terbaik diantara metode lain yang dicoba sehingga metode inilah yang digunakan dalam penambatan molekuler inhibitor HIV-Protease pada 1TQN.

Penambatan molekuler tiga molekul inhibitor HIV-Protease (indinavir, nelfinavir, dan tipranavir) pada 1TQN yang dioptimasi dengan cara terbaik dilakukan dengan cara yang sama seperti penambatan molekuler metirapon, kecuali jumlah evaluasi oleh *genetic algorithm* pada satu penambatan ditetapkan sebanyak 2.500.000 karena jumlah torsi fleksibel inhibitor HIV-Protease lebih banyak dan menurut tutorial ADT, *genetic algorithm* untuk ligan dengan torsi fleksibel antara 8 hingga 10 perlu diperbesar 10 kali lipat atau lebih (50).

Hasil penambatan molekuler ketiga inhibitor HIV-Protease menunjukkan bahwa senyawa inhibitor HIV-Protease berinteraksi dengan situs aktif CYP3A4 melalui sekitar 4 buah interaksi hidrofobik dan diperkuat dengan satu ikatan hidrogen atau lebih. Hal ini sesuai dengan penelitian David R. Jones dan rekannya yang menunjukkan bahwa penghambatan CYP3A4 melalui pembentukan metabolit antara melibatkan 4 interaksi hidrofobik dan sebuah ikatan hidrogen (56).

Pada inhibitor HIV-Protease, interaksi hidrofobik dapat terbentuk oleh gugus-gugus hidrofob yang dimiliki, sedangkan ikatan hidrogen terbentuk oleh gugus hidroksi yang menjadi pusat struktur, gugus amida (ikatan peptida), dan atau gugus lain yang dapat menjadi donor atau akseptor ikatan hidrogen. Situs aktif CYP3A4 terbentuk oleh gugus heme sebagai dasar dan dibatasi oleh heliks I, *loop* antara heliks K dan β 2, *loop* antara heliks F-F', *loop* antara heliks G-G', *loop* antara heliks B-C, dan *loop* antara β 3 (Gambar 22a). Pada daerah situs aktif tersebut, residu dengan rantai samping hidrofob

yang mengarah ke celah situs aktif dan berinteraksi dengan inhibitor HIV-Protease hasil penambatan molekuler, antara lain F57, F108, F213, F215, F304, A305, I369, A370, L482, dan L483, sedangkan residu dengan rantai samping bersifat polar dan berpotensi membentuk ikatan hidrogen dengan inhibitor HIV-Protease berdasarkan hasil penambatan molekuler adalah S119, R212, E308, T309, M371, dan E374 (Gambar 22a). Empat daerah hidrofob yang berperan dalam penghambatan CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease antara lain daerah pertama di sekitar gugus heme oleh residu A305, I369, dan A370, daerah kedua pada celah antara heliks I dan *loop* β 3 oleh F304, L482, dan L483, daerah ketiga pada celah antara *loop* penghubung heliks K- β 2, heliks A, dan *loop* penghubung heliks F-F' oleh residu F57, dan F215, serta daerah keempat dekat *solvent channel* pada *loop* penghubung heliks B-C oleh residu F108, I120, F213, dan F241 (Gambar 22b). Beberapa residu pada CYP3A4 dengan rantai samping polar juga tampak berperan pada interaksi hidrofobik karena memiliki bagian hidrofob, seperti rantai karbon, yang mengarah pada situs aktif CYP3A4, dan bagian polar yang mengarah keluar situs aktif. Residu-residu tersebut antara lain T309 pada daerah pertama, E308 pada daerah kedua, dan E374 pada daerah ketiga. Sebaliknya, residu I369 yang memiliki rantai samping non-polar berperan dalam membentuk ikatan hidrogen melalui gugus keton yang dimilikinya.

Dari ketiga inhibitor HIV-Protease yang ditambatkan pada 1TQN, nelfinavir memberikan hasil penambatan molekuler terbaik karena pengelompokkan 100 konformasi yang diperoleh pada satu proses

penambatan molekuler menunjukkan adanya *cluster* yang signifikan (*cluster* terbaik) dan *cluster* ini menempati urutan pertama pada hasil penambatan molekuler (hasil penambatan terbaik) (Gambar 27a). Hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN memberikan dua kemungkinan posisi, yaitu konformasi pertama (Gambar 27b) dengan perubahan energi bebas pengikatan (ΔG) sekitar $-11.67 \text{ kcal mol}^{-1}$ dan konstanta inhibisi (K_i) sekitar 2.82 nM , dan konformasi kedua (Gambar 27c) dengan ΔG sekitar $-9.87 \text{ kcal mol}^{-1}$ dan K_i sekitar 64.13 nM . Kedua konformasi ini sesuai untuk pembentukan metabolit utama dari nelfinavir, yaitu M8 (Gambar 36a). Akan tetapi, penelitian secara *in vitro* yang dilakukan oleh Vandana N. Hirani dan rekannya menunjukkan bahwa CYP3A4 tidak berperan dalam pembentukan M8 (55), oleh sebab itu, posisi nelfinavir yang diperoleh pada CYP3A4 mungkin hanya menunjukkan posisi penghambatan CYP3A4 oleh nelfinavir tanpa disertai oleh kecenderungan metabolisme. Penelitian lainnya oleh David R. Jones dan rekannya (56) menunjukkan bahwa nelfinavir menghambat CYP3A4 melalui pembentukan metabolit antara sehingga penelitian dilanjutkan dengan penambatan molekuler metabolit antara nelfinavir-M8 (dengan penambahan atom O pada gugus *t*-butil yang mewakili monooksigenasi gugus *t*-butil nelfinavir) pada CYP3A4.

Hasil penambatan molekuler metabolit antara nelfinavir ternyata menunjukkan posisi yang serupa dengan hasil penambatan molekuler nelfinavir serta atom O yang ditambahkan mengarah pada ion Fe dari heme yang berperan utama pada metabolisme (Gambar 36b dan 36c). Nilai K_i yang

dimiliki konformasi 2 (Gambar 36c) hasil penambatan molekuler metabolit antara nelfinavir ($0.241 \mu\text{M}$) juga mendekati nilai K_i yang diperoleh dari percobaan *in vitro* ($0.31\text{-}4.8 \mu\text{M}$) (22). Dengan demikian, hasil penambatan molekuler yang dilakukan menunjukkan bahwa nelfinavir menghambat CYP3A4 melalui pembentukan metabolit antara dengan posisi yang mengarah pada pembentukan M8. Metabolit M8 yang tidak terdeteksi pada penelitian Vandani N. Hirani dan rekannya dapat disebabkan penghambatan yang bersifat ireversibel dari metabolit antara nelfinavir (56) sehingga tidak ada M8 yang dihasilkan atau dilepaskan oleh CYP3A4. Pada posisi terbaik yang diperoleh dari hasil penambatan molekuler, nelfinavir menempati empat daerah hidrofobik dengan baik disertai dengan satu hingga dua ikatan hidrogen, yaitu antara gugus hidroksi pusat Nelfinavir dengan R212 dan antara gugus hidroksifenil nelfinavir dengan S119 atau antara I369 dengan gugus N dari nelfinavir (Gambar 28-29).

Hasil penambatan molekuler indinavir juga menunjukkan dua kemungkinan posisi indinavir dalam menghambat CYP3A4 dan kedua posisi ini juga menempati empat daerah hidrofobik dengan baik dan memiliki satu hingga dua ikatan hidrogen, yaitu dengan R212, serta dengan S119 atau I369 (Gambar 24-25). Konformasi pertama (Gambar 23b) memiliki ΔG sekitar $-7.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ dan K_i sekitar $5.97 \mu\text{M}$, sedangkan konformasi kedua (Gambar 23c) memiliki ΔG sekitar $-6.73 \text{ kcal mol}^{-1}$ dan K_i sekitar $14.58 \mu\text{M}$. Akan tetapi, kedua posisi indinavir ini tidak sesuai dengan posisi untuk pembentukan metabolit yang telah diketahui dari indinavir melalui penelitian

in vitro (57), padahal menurut penelitian David R. Jones, indinavir juga menghambat CYP3A4 melalui pembentukan metabolit antara sama seperti nelfinavir (56). Hal ini dapat dikarenakan penghambatan CYP3A4 oleh indinavir juga bersifat ireversibel seperti nelfinavir sehingga pada posisi inhibisi yang diprediksi melalui penambatan molekuler tidak terjadi pelepasan metabolit dan tidak ada kesesuaian posisi dengan metabolit indinavir yang telah diketahui. Perbedaan prediksi posisi ini juga diduga menyebabkan perbedaan nilai K_i dari indinavir terhadap CYP3A4 yang diperoleh pada penelitian ini (5.97-14.58 μM) dengan percobaan *in vitro* (0.17-0.9 μM) (22).

Tipranavir merupakan substrat dari CYP3A4 dan tidak menghambat aktivitas CYP3A4. Akan tetapi, tipranavir tetap disertakan dalam penelitian ini karena memiliki torsi fleksibel yang memenuhi persyaratan serta untuk membantu analisis dalam membedakan interaksi antara substrat dan inhibitor CYP3A4 yang berasal dari senyawa golongan inhibitor HIV-Protease. Sayangnya, hasil penambatan molekuler tipranavir tidak memberikan hasil yang signifikan karena tidak ada *cluster* dengan jumlah anggota yang berarti (Gambar 31a). Meskipun demikian, konformasi dengan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler menunjukkan kemiripan posisi pada penambatan berulang dan ada 3 konformasi pada tipranavir yang relatif signifikan dibandingkan dengan konformasi lain (Gambar 31b-d).

Konformasi ini menunjukkan bahwa struktur tipranavir juga berupaya menempati 4 daerah hidrofobik tetapi kurang sempurna (Gambar 35) karena tipranavir memiliki struktur yang cenderung lurus dengan rantai samping

gugus hidrofob yang kecil, sedangkan gugus hidrofob yang besar terletak pada rantai utama. Hal ini berbeda dengan struktur indinavir dan nelfinavir yang cenderung bercabang dengan rantai samping berupa gugus hidrofob yang besar. Konformasi terbaik tipranavir juga menunjukkan kemungkinan terjadinya ikatan hidrogen hanya dengan R212 yang terletak pada situs aktif 1TQN (Gambar 32-34). Hasil penambatan molekuler tipranavir memprediksi metabolisme tipranavir terjadi pada bagian hidrofob (alkil atau fenil) yang terletak di tengah struktur tetapi prediksi metabolisme melalui penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa metabolisme tipranavir terjadi pada gugus fenil yang terletak pada bagian tepi struktur (58). Perbedaan prediksi metabolit yang terjadi dapat disebabkan adanya metabolit tipranavir yang tidak teridentifikasi pada penelitian *in vivo* atau prediksi konformasi yang dilakukan teknik penambatan molekuler hanya berupaya menempatkan tipranavir di dalam kotak simulasi (*grid box*) dengan konformasi terbaik sehingga tidak memprediksi mekanisme pengikatan hingga masuknya tipranavir ke dalam situs aktif CYP3A4.

Berdasarkan analisis terhadap hasil penambatan molekuler indinavir, nelfinavir, dan tipranavir, interaksi inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease terjadi melalui empat buah interaksi hidrofobik dalam konformasi yang memerlukan adanya percabangan gugus hidrofob, terutama gugus hidrofob yang besar (*bulky*), pada struktur inhibitor HIV-Protease dan sedikitnya memerlukan satu ikatan hidrogen. Beberapa perbedaan prediksi hasil penambatan molekuler (*in silico*) dengan hasil penelitian *in vitro* dan *in*

vivo dapat disebabkan oleh keterbatasan yang ada pada penelitian *in vivo*, *in vitro*, atau *in silico*. Pada penelitian *in silico*, faktor keterbatasan dapat disebabkan keterbatasan alat (perangkat keras), program (perangkat lunak), metode, dan teknik yang digunakan. Perbedaan prediksi posisi melalui perbandingan dengan struktur metabolit dapat dikarenakan teknik penambatan molekuler hanya mampu memprediksi interaksi ligan dengan makromolekul di dalam kotak simulasi yang ditentukan (*grid box*) tetapi tidak mampu memprediksi mekanisme atau proses yang mengawali terjadinya pengikatan ligan. Selain itu, inhibitor HIV-Protease memiliki struktur dengan torsi fleksibel yang cukup banyak sehingga interaksinya dengan CYP3A4 cukup sulit diprediksi. Mekanisme *induced-fit* yang terjadi akibat fleksibilitas situs aktif CYP3A4 juga membatasi kemampuan metode penambatan molekuler dalam memprediksi posisi inhibitor HIV-Protease yang tepat dalam menghambat CYP3A4. Meskipun demikian, metode penambatan molekuler mampu memberikan hasil yang cukup akurat dan diharapkan metode ini akan terus dikembangkan sehingga dapat diperoleh program-program dengan kemampuan yang lebih baik.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

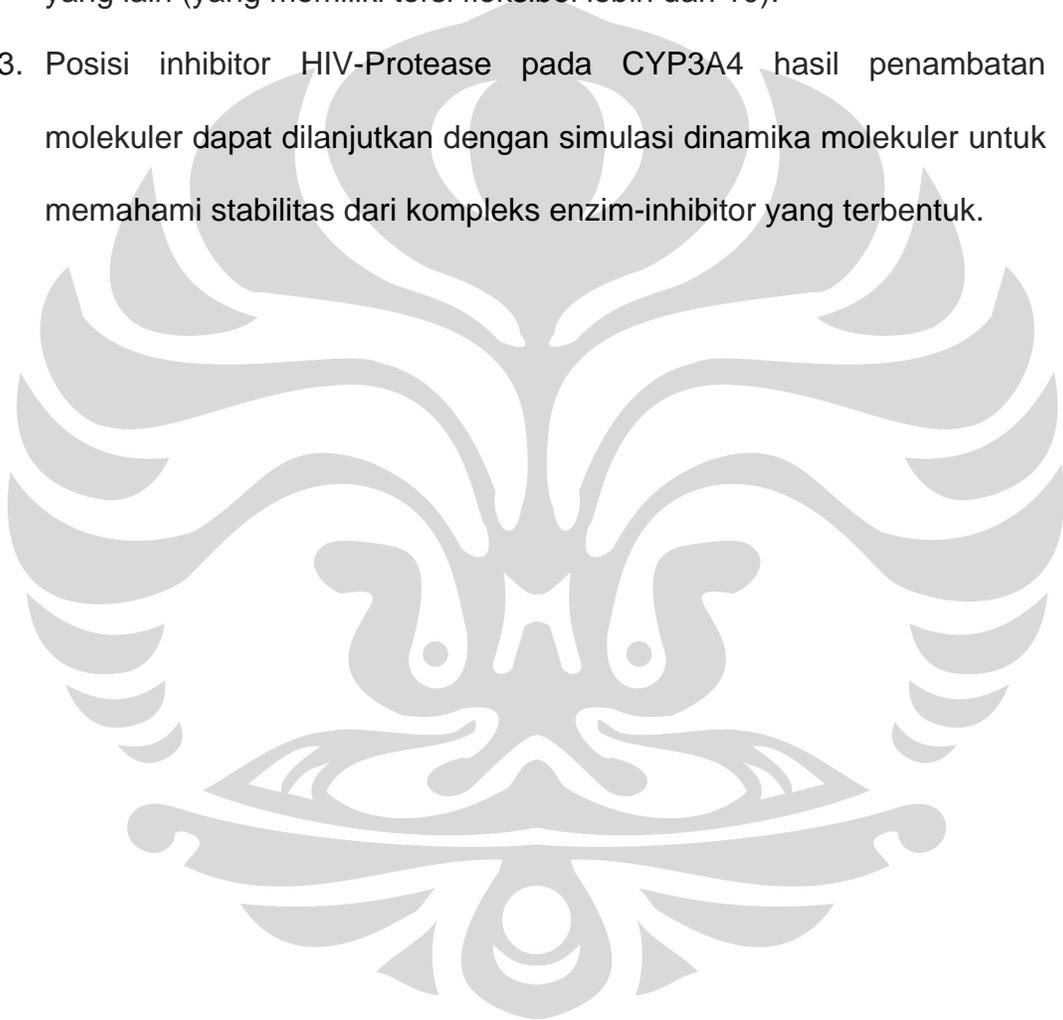
1. Protokol penambatan molekuler CYP3A4 dengan identitas PDB 1TQN yang menerapkan minimisasi dengan metode *trust* dan mempertahankan konformasi gugus heme memberikan hasil penambatan molekuler yang lebih baik daripada protokol yang tidak menerapkan minimisasi dan protokol yang menerapkan minimisasi dengan metode *trust* secara penuh.
2. Inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease, yang diwakili oleh indinavir dan nelvinavir, serta dibandingkan dengan tipranavir, melibatkan 4 buah interaksi hidrofobik dan sedikitnya 1 ikatan hidrogen serta bergantung pada jenis dan posisi gugus hidrofob pada struktur inhibitor HIV-Protease.

B. SARAN

1. Optimasi CYP3A4 dapat dicoba dengan metode atau program yang lain dengan harapan diperoleh protokol penambatan molekuler CYP3A4 yang memberikan hasil lebih baik.
2. Prediksi inhibisi CYP3A4 oleh inhibitor HIV-Protease melalui teknik penambatan molekuler dapat dicoba atau dimodifikasi dengan

algoritme, parameter, atau program penambatan molekuler lain, terutama yang memiliki kemampuan lebih baik, sehingga dapat diperoleh hasil penambatan molekuler yang lebih baik dan penambatan molekuler dapat dilakukan dengan inhibitor HIV-Protease yang lain (yang memiliki torsi fleksibel lebih dari 10).

3. Posisi inhibitor HIV-Protease pada CYP3A4 hasil penambatan molekuler dapat dilanjutkan dengan simulasi dinamika molekuler untuk memahami stabilitas dari kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk.



DAFTAR PUSTAKA

1. Guengerich, FP. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, **21**: 70-83.
2. Tanaka, T, Okuda, T, Yamamoto, Y. Characterization of the CYP3A4 Active Site by Homology Modeling. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, **52**(7): 830-835.
3. Ekroos, M, Sjögren, T. Structural Basis for Ligand Promiscuity in Cytochrome P450 3A4. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 2006, **103**(37): 13682-13687.
4. Antona, CR, Bort, R, Jover, R, Tindberg, N, Sundberg, MI, Lechon, MJG, Castell, JV. Transcription Regulation of CYP3A4 Basal Expression by CCAAT Enhancer-Binding Protein α and Hepatocyte Nuclear Factor-3. *Mol. Pharm.* 2003, **63**(5): 1180-1189.
5. Lamb, DC, Waterman, MR, Kelly, SL, Guengerich, FP. Cytochromes P450 and Drug Discovery. *Curr. Op. Biotech.* 2007, **18**: 504-512.
6. Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA, Rodwell, VW. *Biokimia Harper*. Ed. 27. Terj. dari *Harper's Illustrated Biochemistry*, 27th Ed., oleh dr. Brahm U. Pedit. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2009.
7. Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA, Rodwell, VW. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th Ed. USA: Mc Graw-Hill, 2003.
8. Koolman, J, Roehm, KH. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd Ed. New York: Thieme Stuttgart, 2005.
9. Berg, JM, Tymoczko, JL, Stryer, L. *Biochemistry*. 5th Ed. New York: W. H. Freeman and Co., 2002.
10. Tredger, JM, Stoll, S. Cytochromes P450 – Their Impact on Drug Treatment. <http://www.pharmj.com/pdf/hp/200206/hp%20jun29,p16773.pdf>, 14 Januari 2009, pukul 15.46 BBWI.
11. Nath, A, Grinkova, YV, Sligar, SG, Atkins, WM. Ligand Binding to Cytochrome P450 3A4 on Phospholipid Bilayer Nanodisc: The Effect of Model Membranes. *J. Biol. Chem.* 2007, **282**(39): 28309-28320.

12. Isin, EM, Guengerich, FP. Substrate Binding to Cytochrome P450. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, DOI10.1007/s00216-008-2244-0.
13. Novartis Pharmaceuticals Canada Inc. New Contraindication Regarding Ergotamin- and dihydroergotamin-containing Drugs: Risk for Cerebral and/or Peripheral Ischemia. http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/medeff/ergotamine_hpc-cps-eng.pdf, 19 Januari 2009, pukul 14.56 BBWI.
14. Yano, JK, Wester, MR, Schoch, GA, Griffin, KJ, Stout, CD, Johnson, EF. The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-Ray Crystallography to 2.05 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**: 38091-38094.
15. Zhou, SF. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Curr. Drug Metab.* 2008, **9**: 310-322.
16. Williams, PA, Cosme, J, Vinkovic, DM, Ward, A, Angove, HC, Day, PJ, Vonrhein, C, Tickle, IJ, Jhoti, H. Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone dan Progesterone. *Science.* 2004, **305**: 683-686.
17. Ikezoe, T, Hisatake, Y, Takeuchi, T, Ohtsuki, Y, Yang, Y, Said, JW, Taguchi, H, Koeffler, HP. HIV-1 Protease Inhibitor, Ritonavir: A Potent Inhibitor of CYP 3A4, Enhanced the Anticancer Effects of Docetaxel in Androgen-independent Prostate Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancer Res.* 2004, **64**(20): 7426-31.
18. Denisov, IG, Makris, TM, Sligar, SG, Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* 2005, **105**: 2253-2277.
19. Brik, A, Wong, CH. HIV-1 Protease: Mechanism and Drug Discovery. *Org. Biomol. Chem.* 2003, **1**: 5-14.
20. Leung, D, Abbenante, G, Fairlie, DP. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *J. Med. Chem.* 2000, **43**(3): 305-341.
21. Anonim. Approved Medications to Treat HIV Infection. http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/ApprovedMedstoTreatHIV_FS_en.pdf, 13 Maret 2009, pukul 18.18 BBWI.

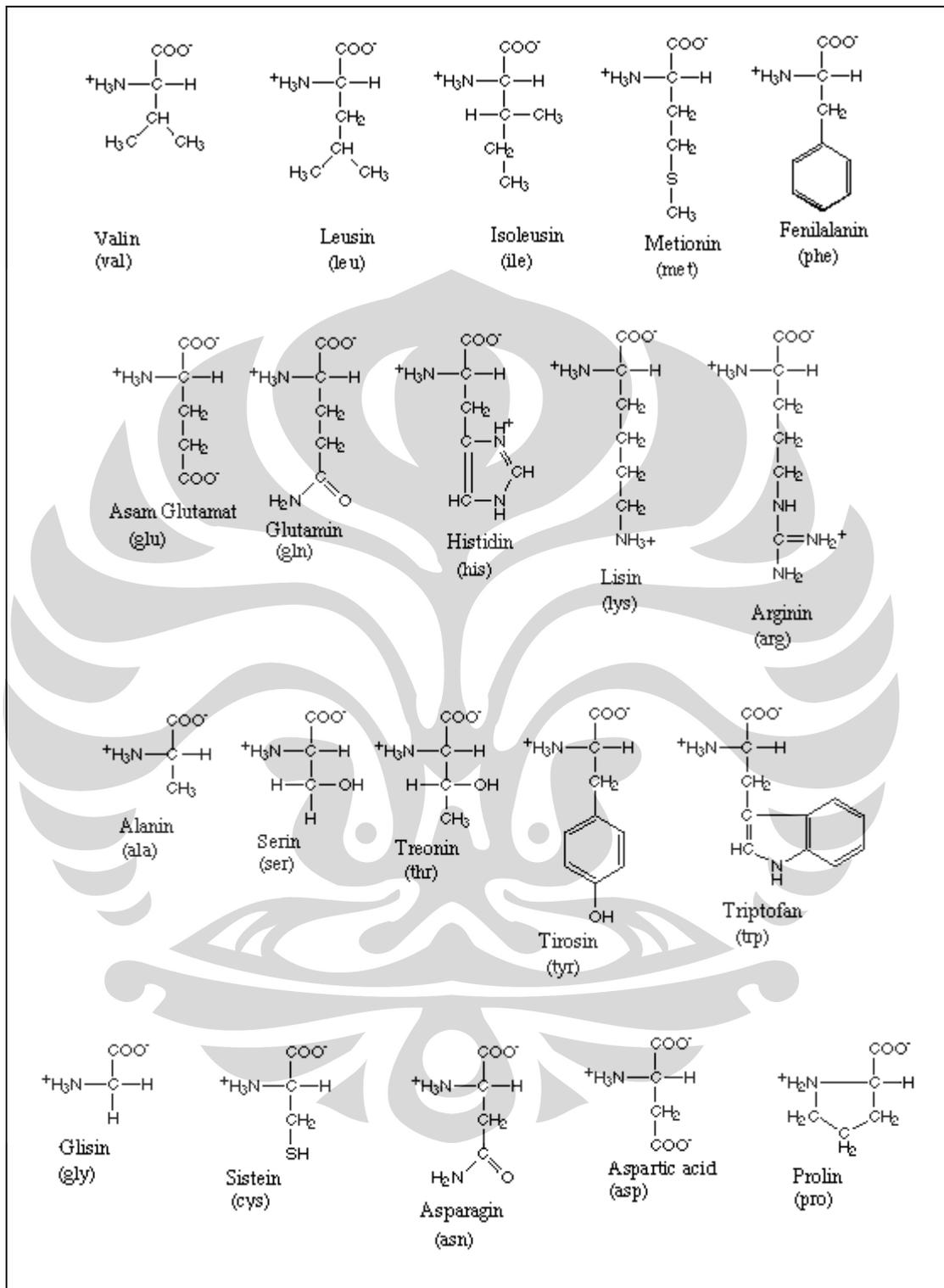
22. Granfors, MT, Wang, JS, Kajosaari, LI, Laitila, J, Neuvonen, PJ, Backman, JT. Differential Inhibition of Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 3A7 by Five Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease Inhibitors *in vitro*. *Basic Clin. Pharm. Tox.* 2006, **98**: 79-85.
23. Ernest II, CS, Hall, SD, Jones, DR. Mechanism-Based Inactivation of CYP3A by HIV Protease Inhibitors. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2005, **312**(2): 583-591.
24. Chuck, SK, Rodvold, KA, Moltke, LLV, Greenblatt, DJ, Shader, RI. *Psychosocial and Public Health Impacts of the New HIV Therapies*. United States: Springer US, 2006.
25. Aprijani, DA, Elfaizi, MA. Bioinformatika: Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia. <http://www.kambing.ui.ac.id/bebas/vo6/kulliah/sistemoperasi/2003/50/Bioinformatika.pdf>, 11 Februari 2009, pukul 14.45 BBWI.
26. Wink, M. *An Introduction to Molecular Biotechnology*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, 2006: 387-390.
27. Lair, S. Computational Chemistry: An Introduction to Molecular Dynamic Simulations. <http://nanohub.org/resources/2088>, 16 Juni 2009, pukul 15.40 BBWI.
28. Schneider, G, Baringhaus, KH. *Molecular Design, Concepts and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, 2008.
29. Schwede T, Peitsch, M. *Computational Structural Biology: Methods and Applications*. Singapura: World Scientific Publishing, 2008.
30. Hawkins, P, Skillman, G. Ligand-Based Design Workflow. http://images.apple.com/science/pdf/ligandbased_design_workflow.pdf, 16 Januari 2009, pukul 13.48 BBWI.
31. Kitchen, DB, Decornez, H, Furr, JR, Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2004, **3**: 935-949.
32. Terfloth, L, Gasteiger, J. Neural Networks and Genetic Algorithms in Drug Design. *Drug Disc. Ther.* 2001, **6**(15): S102-S108.
33. Felton, MJ. Survival of the Fittest in Drug Design. *Mod. Drug Disc.* 2000, **3**(9): 49-54.

34. Li, CL, Yu, S, Dong, YL, Wang, XC,. *A Genetic Algorithm Based Method for Molecular Docking*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
35. Westbrook, J, Feng, Z, Jain, S, Bhat, TN, Thanki, N, Ravichandran, V, Gililand, GL, Bluhm, W, Weissig, H, Greer, DS, Bourne PF, Berman, HM. The Protein Data Bank: Unifying the Archive. *Nuc. Ac. Res.* 2002, **30**(1): 245-248.
36. Bourne, PE., Addes, KJ, Bluhm, W, Chen, L, Desphande, N, Feng, Z, Fleri, W, Green, R, Ott, JCM, Merino, WT, Weissig, H, Westbrook, J, Berman, HM. The Distribution and Query Systems of the RCSB Protein Data Bank. *Nuc. Ac. Res.* 2004, **32**, Database Issue: D223-225.
37. Westbrook, J, Feng, Z, Chen, L, Yang, HW, Berman, HM. The Protein Data Bank and Structural Genomics. *Nuc. Ac. Res.* 2003, **31**(1): 489-491.
38. DeLano, WL. PyMol User's Guide. <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>, 19 Januari 2009, pukul 14.54 BBWI.
39. Thompson, JD, Plewniak, F, Thierry, JC, Poch, O. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nuc. Ac. Res.* 2000, **28**(15): 2919-2926.
40. Katoh, K, Misawa, K, Kuma, K, Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nuc. Ac. Res.* 2002, **30**(14): 3059-3066.
41. Chenna, R, Sugawara, H, Koike, T, Lopez, R, Gibson, TJ, Higgins, DG, Thompson, JD. Multiple Sequence Alignment with the Clustal Series of Programs. *Nuc. Ac. Res.* 2003, **31**(13): 3497-3500.
42. Anonim. The CCP4 Suite: Program for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* 1994, **50**: 760-763.
43. Briggs, P. What's New in CCP4 6.0. <http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter44/articles/newin6.0.html>, 11 Februari 2009, pukul 14.48 BBWI.
44. Maiti, R, Domselaar, GHV, Zhang, HY, Wishart, DS. SuperPose: A Simple Server for Sophisticated Structural Superposition. *Nuc. Ac. Res.* 2004, **32**: 590-594.

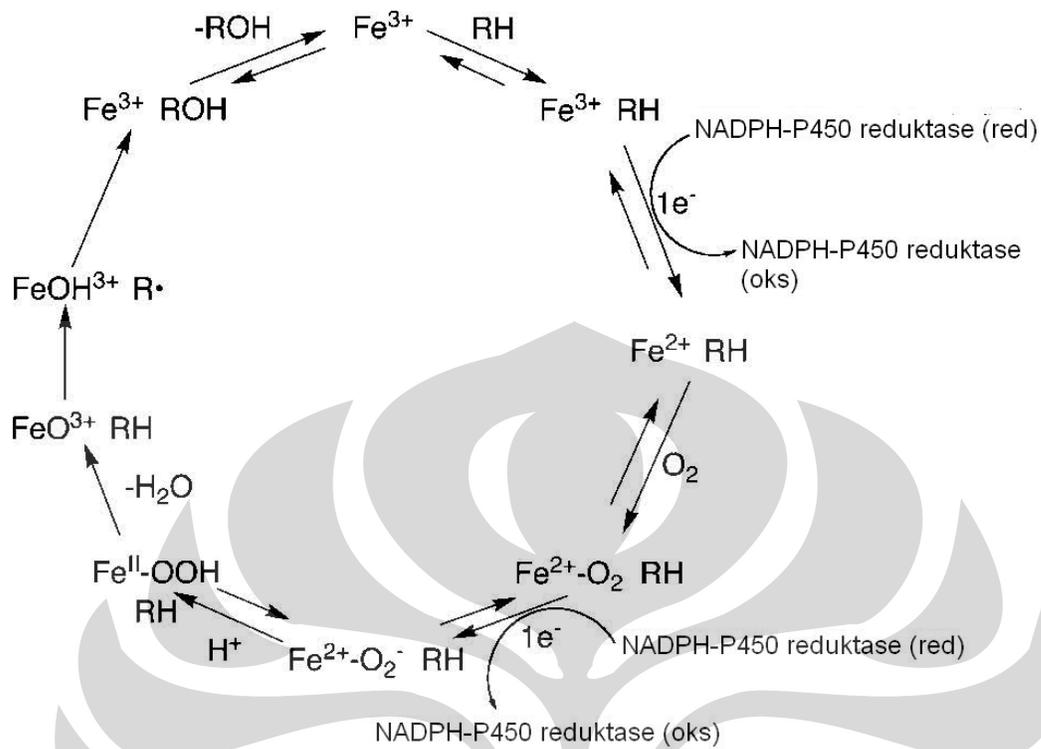
45. Pedretti, A, Mazzolari, A, Vistoli, G. Vega ZZ: a versatile toolkit for drug design and protein modeling. *Protein Eng.* 1995, **8**(2): 127-34.
46. Santos, N., Luiz, C. 3D Visualization Resources into Bioinformatics Application. <http://www.isima.fr/limos/publi/RR-05-07.pdf>, 25 Maret 2009, pukul 14.54 BBWI.
47. Anonim. Cygwin User's Guide. <http://cygwin.com>, 27 April 2009, pukul 12.54 BBWI.
48. Ragno, R, Tramontano, A, Martinelli, A, Tuccinardi, T. *Molecular Docking Tutorial*. <http://www.mmvsl.farm.unipi.it>, 19 November 2008, pukul 20.19 BBWI.
49. Morris, GM, Goodsell, DS, Pique, ME, Lindstorm, W, Huey, R, Forli, S, Hart, WE, Halliday, S, Belew, R, Olson, AJ. User Guide AutoDock: Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors. <http://autodock.scripps.edu>, 11 Januari 2009, pukul 14.26 BBWI.
50. Huey, R, Morris, GM. *Using AutoDock 4 with AutoDock Tools: A Tutorial*. California: The Scripps Research Institute, 2008.
51. Wallace, AC, Laskowski, RA, Thornton, JM. LIGPLOT: a Program to Generate Schematic Diagrams of Protein-Ligand Interactions. *Protein Eng.* 1995, **8**(2): 127-134.
52. Kirchmair, J, Markt, P, Distinto, S, Wolber, G, Langer, T. Evaluation of the Performance of 3D Virtual Screening Protocols: RMSD Comparisons, Enrichment Assesments, and Decoy selection-What Can We Learn from Earlier Mistakes?. *J. Comput. Aided Mol.* 2008, **22**: 213-228.
53. Ahlström, MM, Zamora, I. Characterization of Type II Ligands in CYP3A4 and CYP2C9. *J. Med. Chem.* 2008, **51**(6): 1755-1763.
54. Park, HS, Young, HJ. Toward the Virtual Screening of Cdc25A Phosphatase Inhibitors with the Homology Modeled Protein Structure. *J. Mol. Model.* 2008, **14**: 833-841.
55. Hirani, VN, Raucy, JL, Lasker, JM. Conversion of the HIV Protease Inhibitor Nelfinavir to a Bioactive Metabolite by Human Liver CYP2C19. *Drug Metab. Dispos.* 2004, **1743**: 1-24.

56. Jones, DR, Ekins, S, Li, L, Hall, SD. Computational Approaches that Predict Metabolic Intermediate Complex Formation with CYP3A4 (+b₅). *Drug Metab. Dispos.* 2007, **35**: 1466-1475.
57. Hao, C, Campbell, S, Stranz, D, McSweeney, N. Identification of In-Vitro Metabolites of Indinavir using Automated LC/MS/MS Acquisition, In-Silico Prediction, and Structure-Based Data Analysis. <http://www.massspec.com/HaoEtAl.html>, 8 April 2009, pukul 21.19 BBWI.
58. Chen, LZ, Sabo, JP, Philip, E, Mao, YP, Norris, SH, MacGregor, TR, Wruck, JM, Garfinkel, S, Castles, M, Brinkman, A, Valdez, H. Steady-state Disposition of the Non-Peptidic Protease Inhibitor Tipranavir when Coadministered with Ritonavir. *Antimicrob. Ag. and Chemother.* 2007, **51**(7): 2436-2444.
59. Abedon, ST. Important Words and Concepts from Stryer *Biochemistry*, 4th Ed. <http://www.mansfield.osu.edu/~sabedon/biochem511.htm>, 3 Juni 2009, pukul 19.25 BBWI.
60. Subramani, P, Rajakannu, P, Sudhakar, P, Jayaprakash, N. Targeting the HIV-1 Reverse Transcriptase, Integrase, P27, by Expression of RNAi Oligonucleotide from Engineered Human Artificial Chromosome. <http://www.jyi.org/research/re.php?id=637>, 10 Juni 2009, pukul 16.05 BBWI.
61. Anonim. DrugBank. <http://www.drugbank.ca>, 27 Maret 2009, pukul 17.10 BBWI.





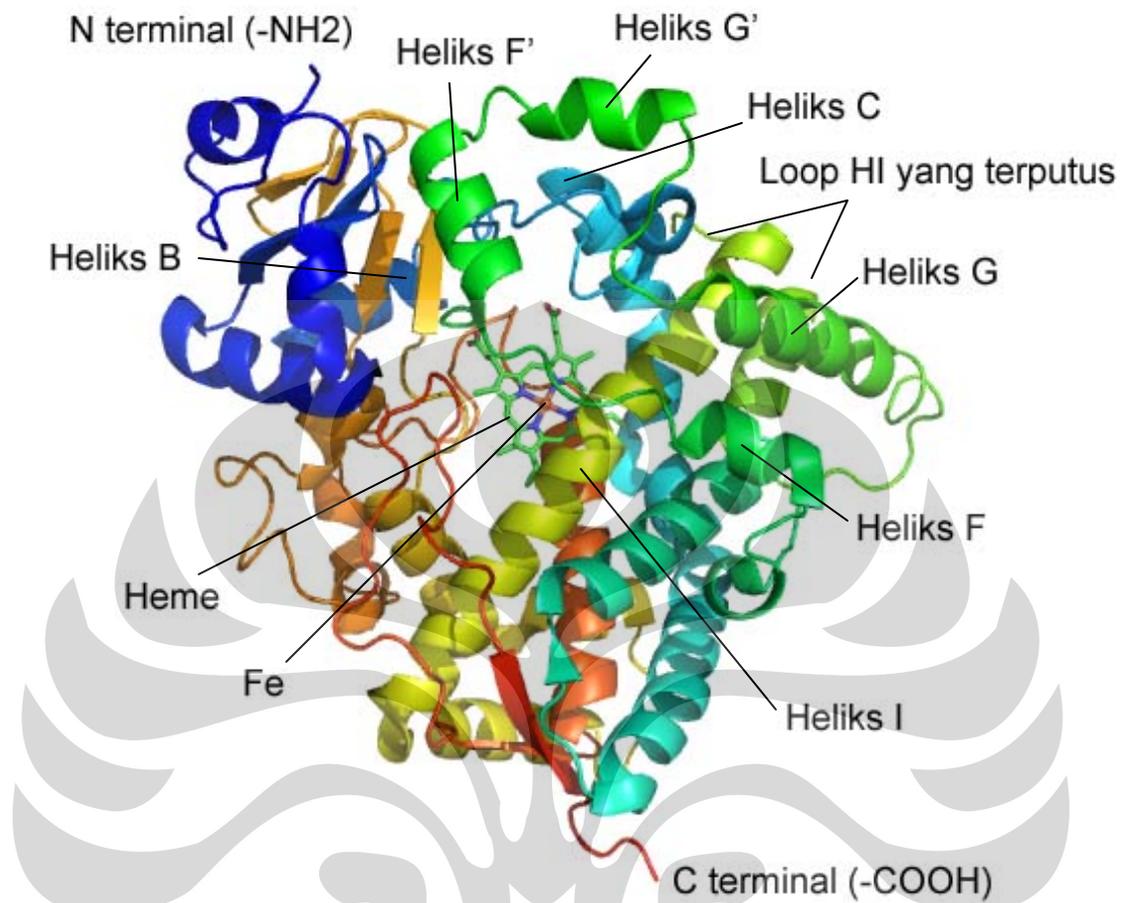
Gambar 1. 20 jenis asam amino penyusun protein (59)



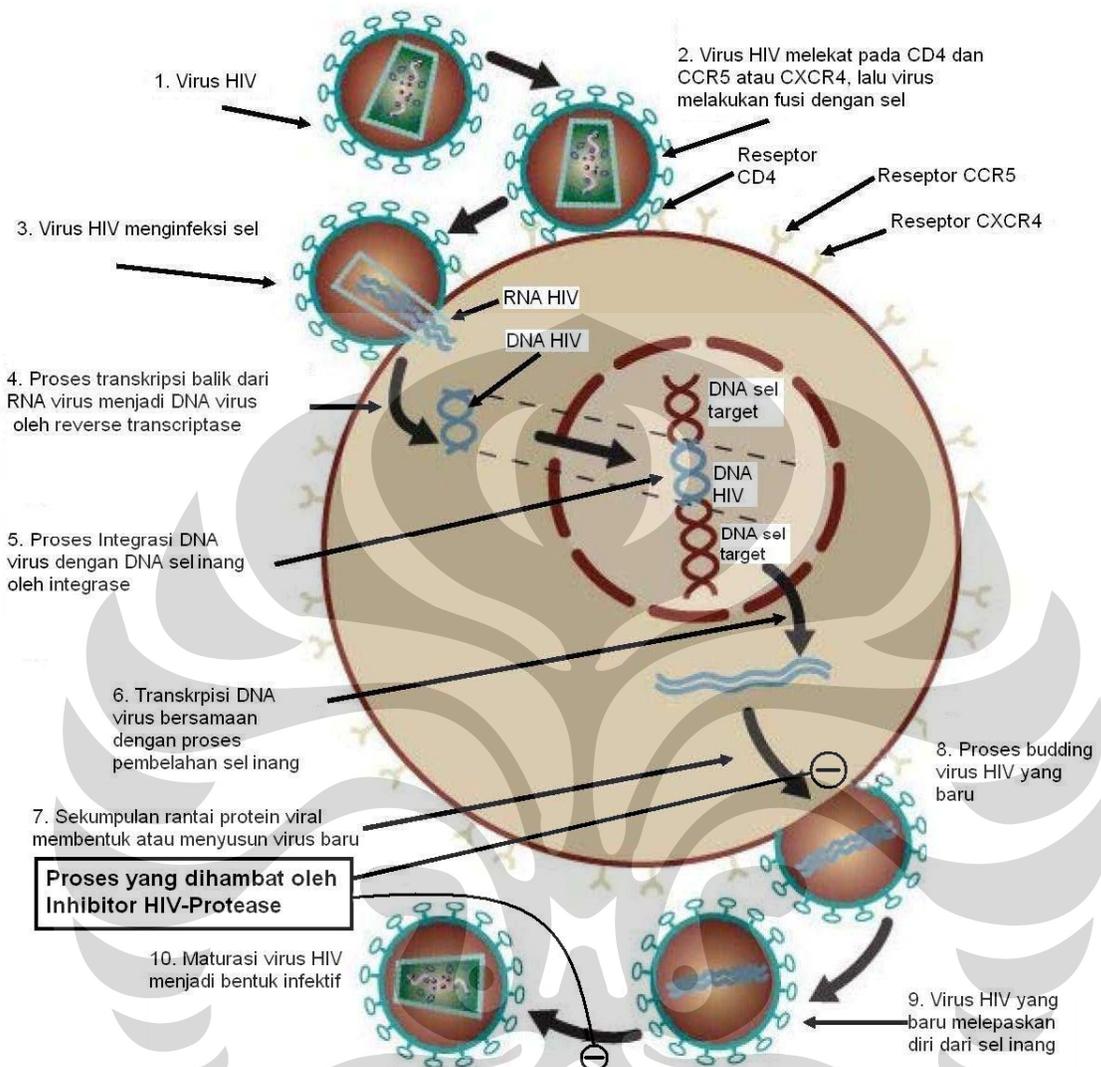
Gambar 2. Mekanisme siklus katalitik oleh sitokrom P450 (1)



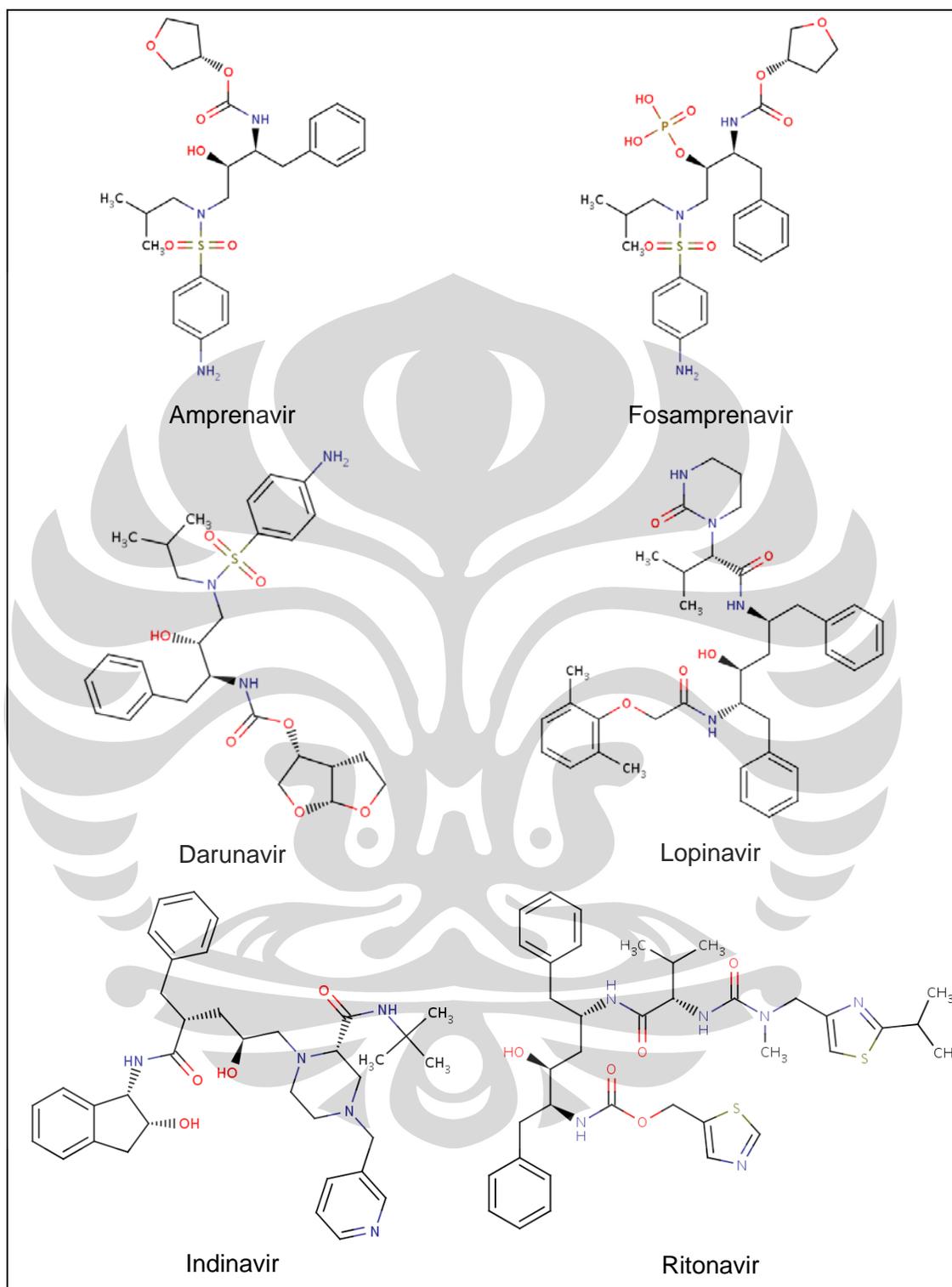
Gambar 3. Struktur umum sitokrom P450 dengan SRS berwarna hitam (18)



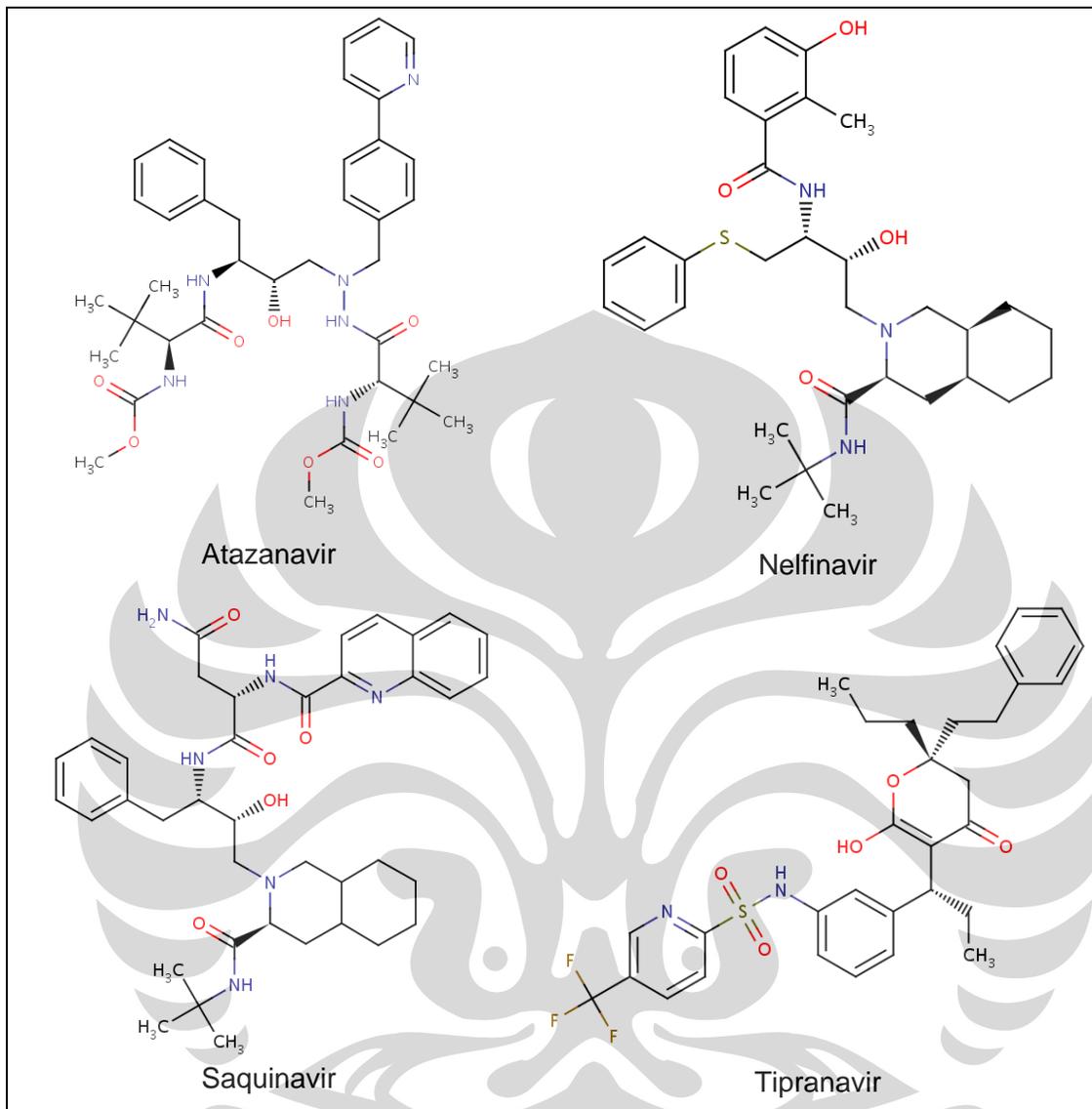
Gambar 4. Struktur sitokrom P450 3A4 (1TQN)



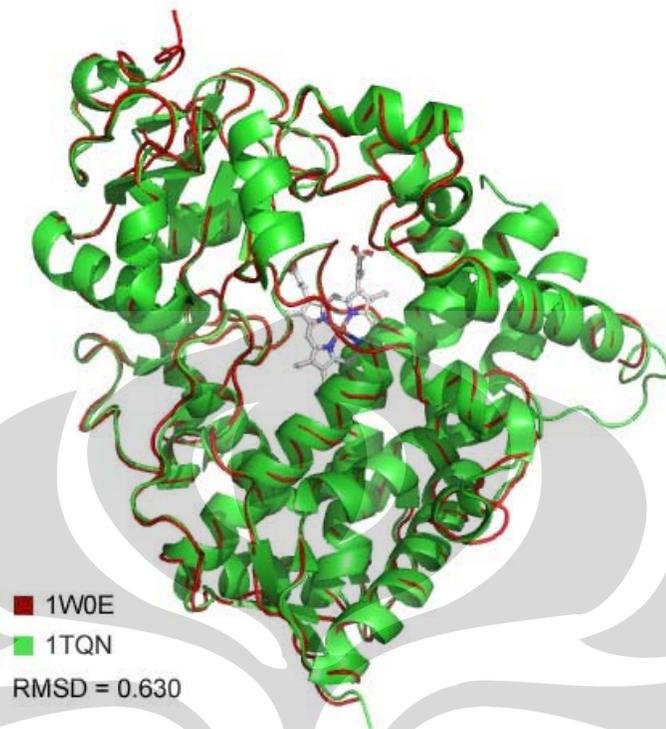
Gambar 5. Siklus hidup HIV dan peran inhibitor HIV-Protease dalam memutus siklus hidup HIV (60)



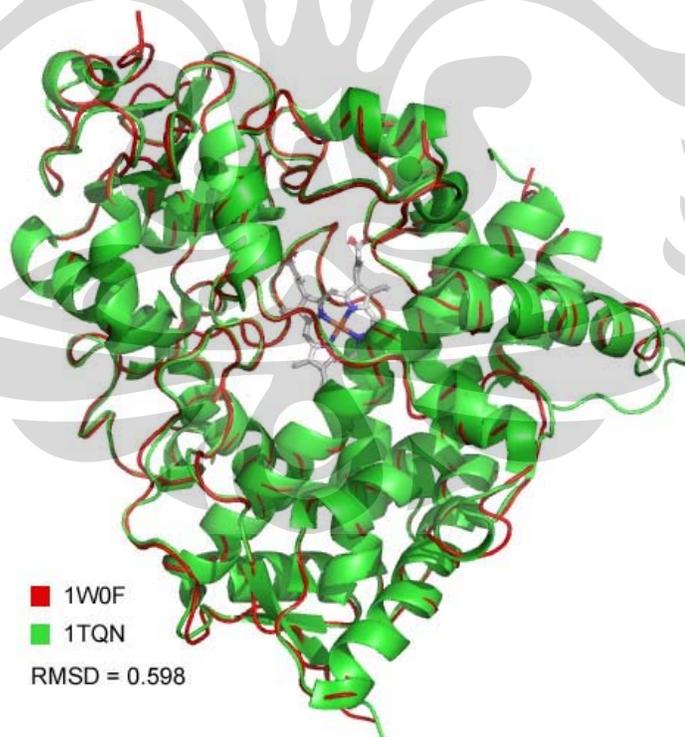
Gambar 6. Struktur sepuluh inhibitor HIV-Protease yang disetujui penggunaannya dalam klinik oleh FDA hingga Desember 2008 (61)



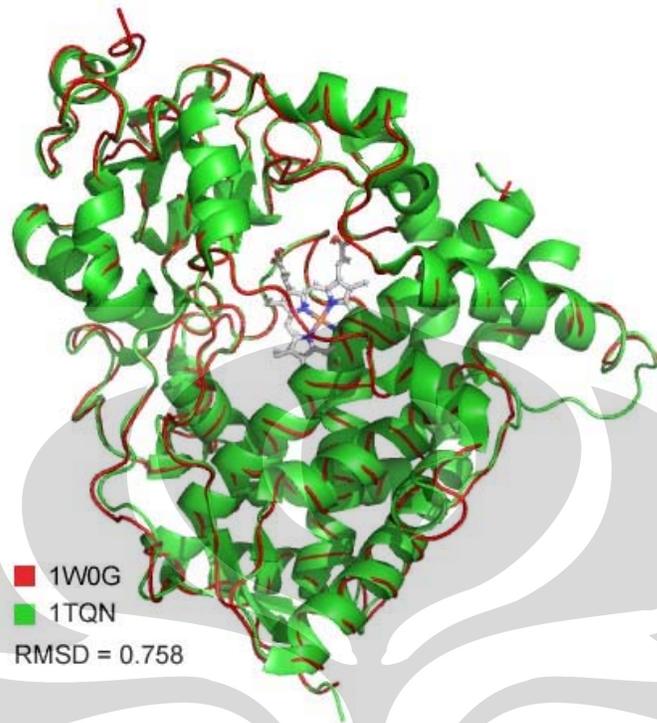
Gambar 6. Struktur sepuluh inhibitor HIV-Protease yang disetujui penggunaannya dalam klinik oleh FDA hingga Desember 2008 (61)
(Lanjutan)



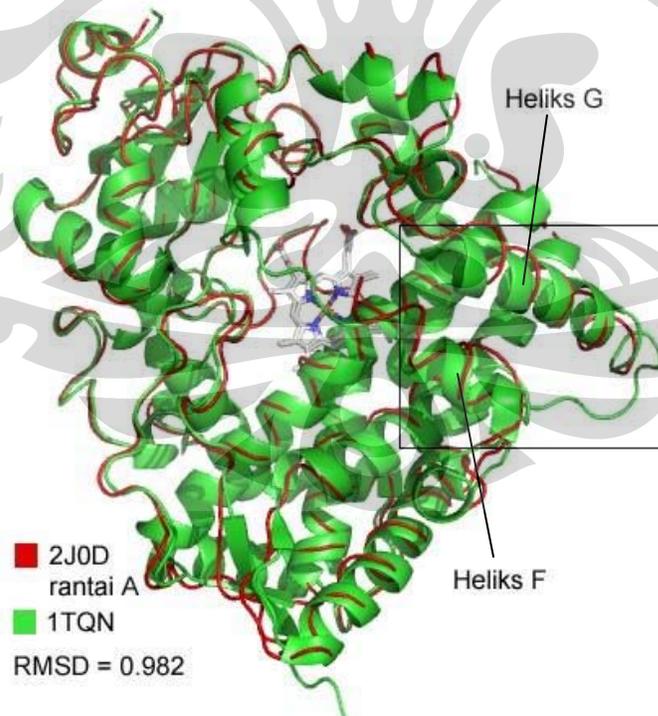
Gambar 7. Hasil superposisi 1W0E ke 1TQN



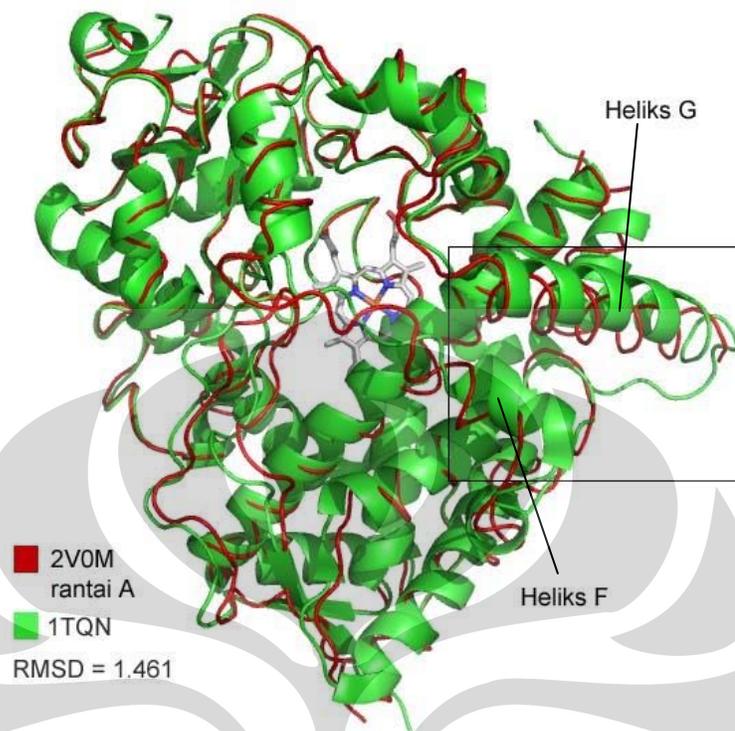
Gambar 8. Hasil superposisi 1W0F ke 1TQN



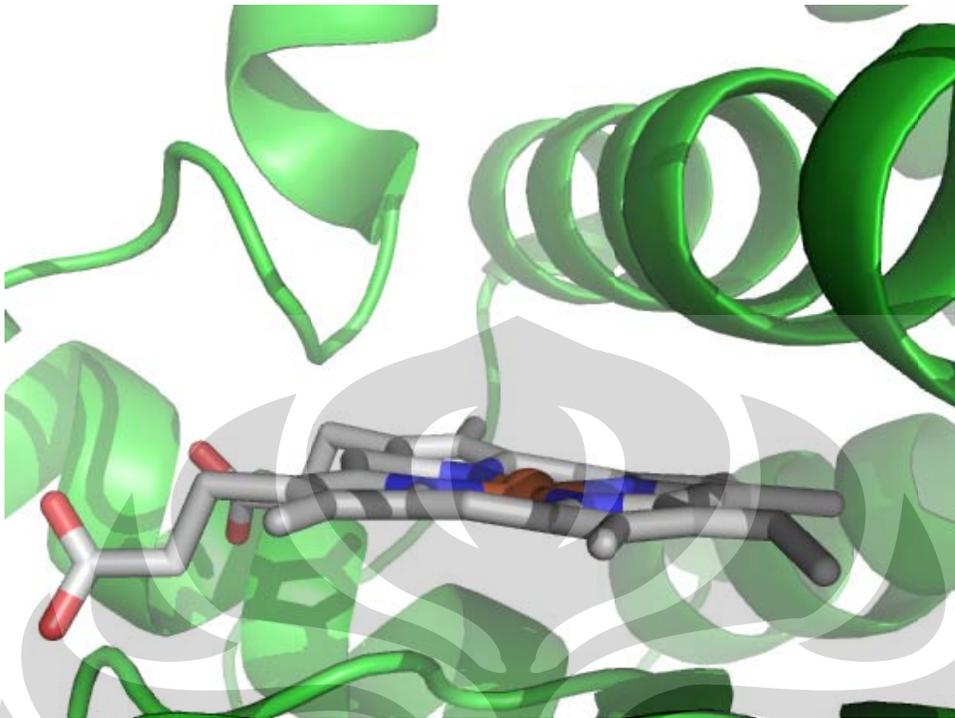
Gambar 9. Hasil superposisi 1W0G ke 1TQN



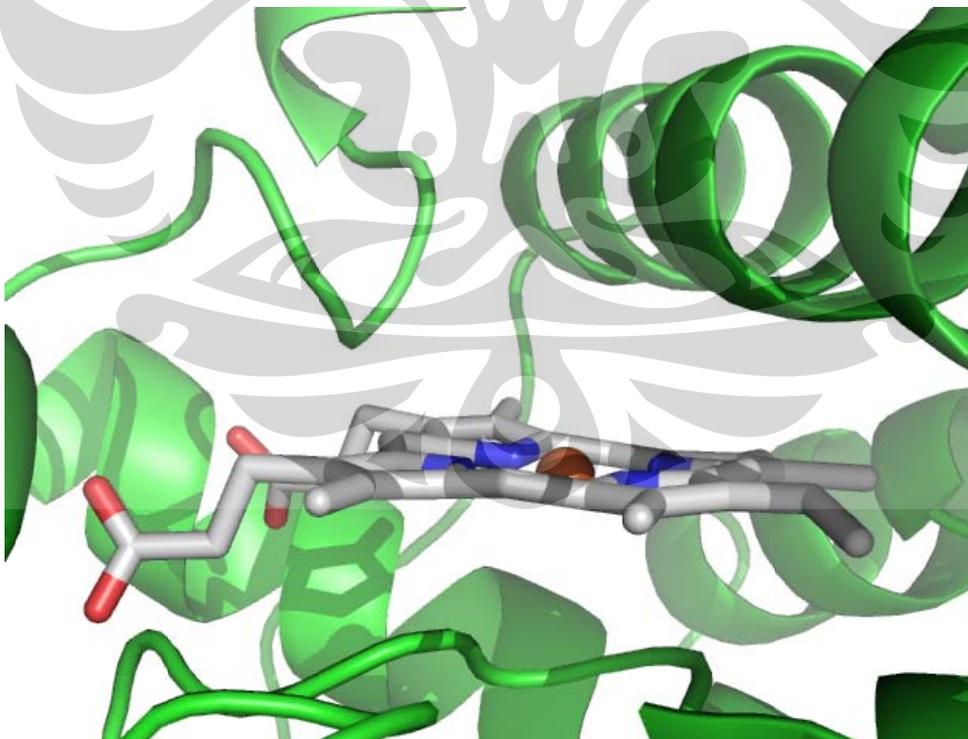
Gambar 10. Hasil superposisi 2J0D rantai A ke 1TQN



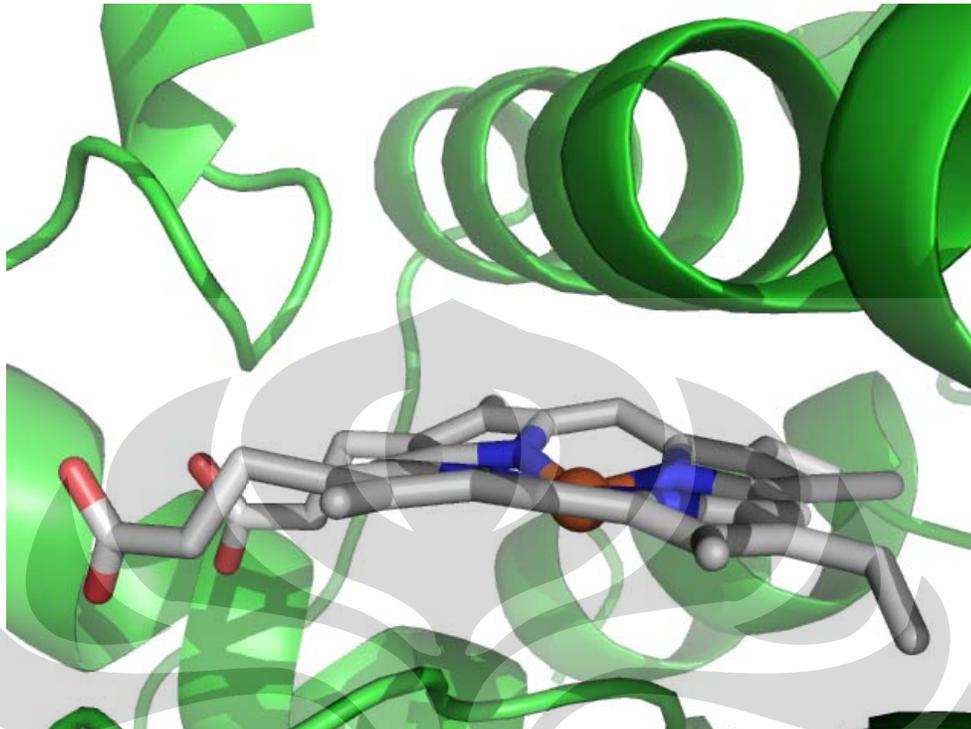
Gambar 11. Hasil superposisi 2V0M rantai A ke 1TQN



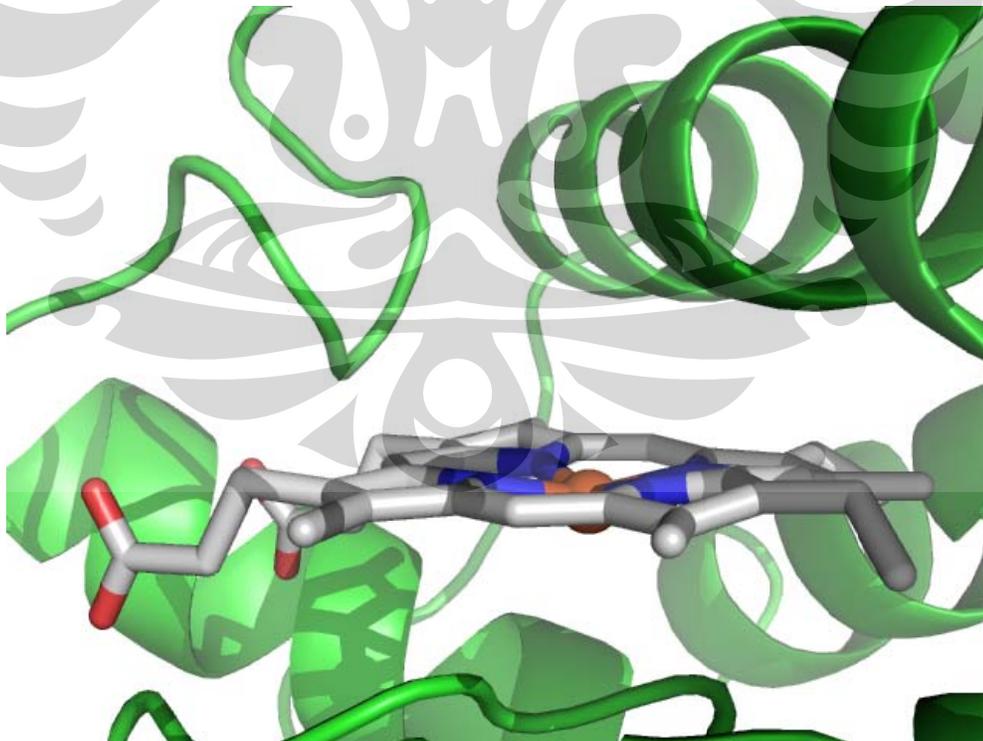
Gambar 12. Gugus heme pada 1TQN



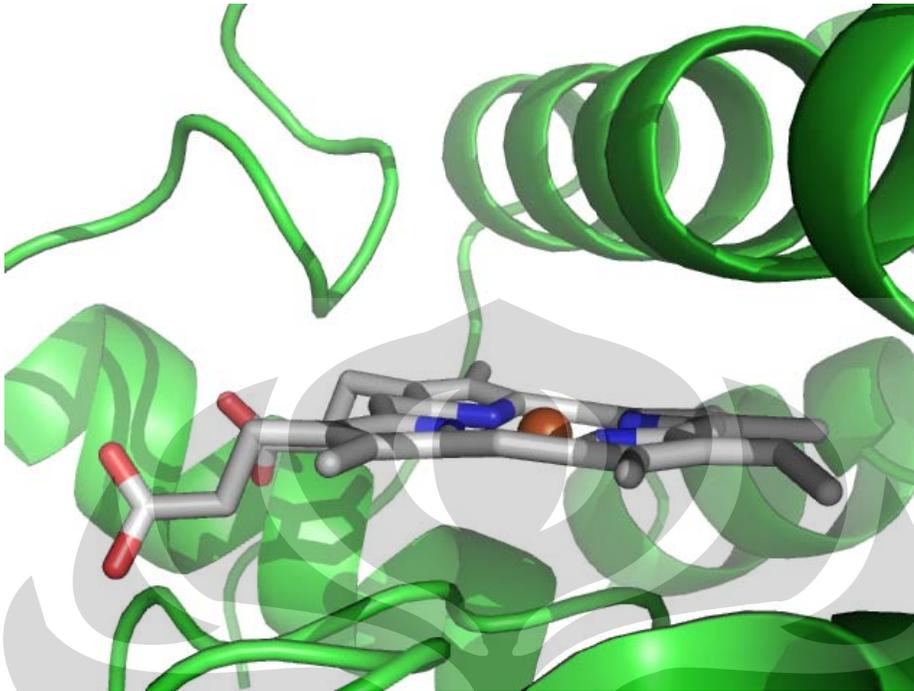
Gambar 13. Gugus heme pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi



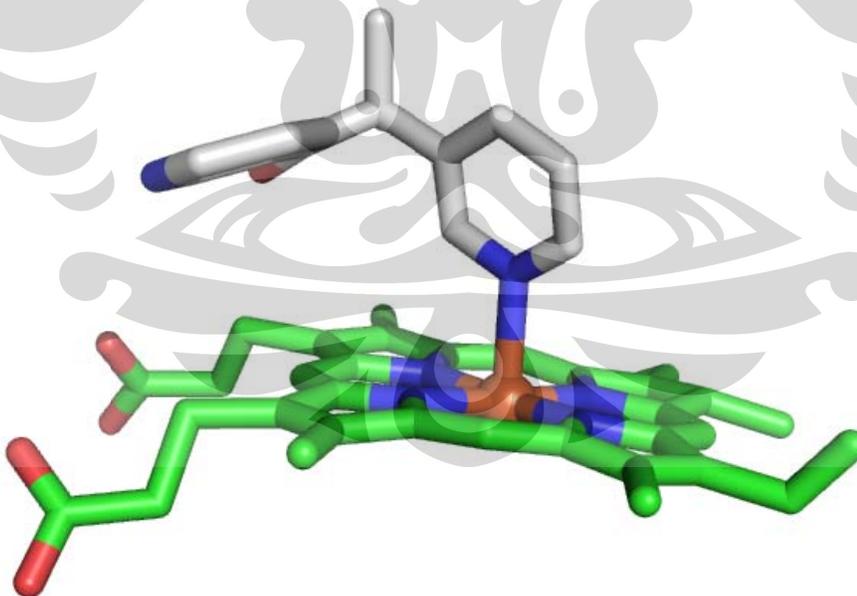
Gambar 14. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara *steepest descent* dan dilanjutkan *conjugate gradient*



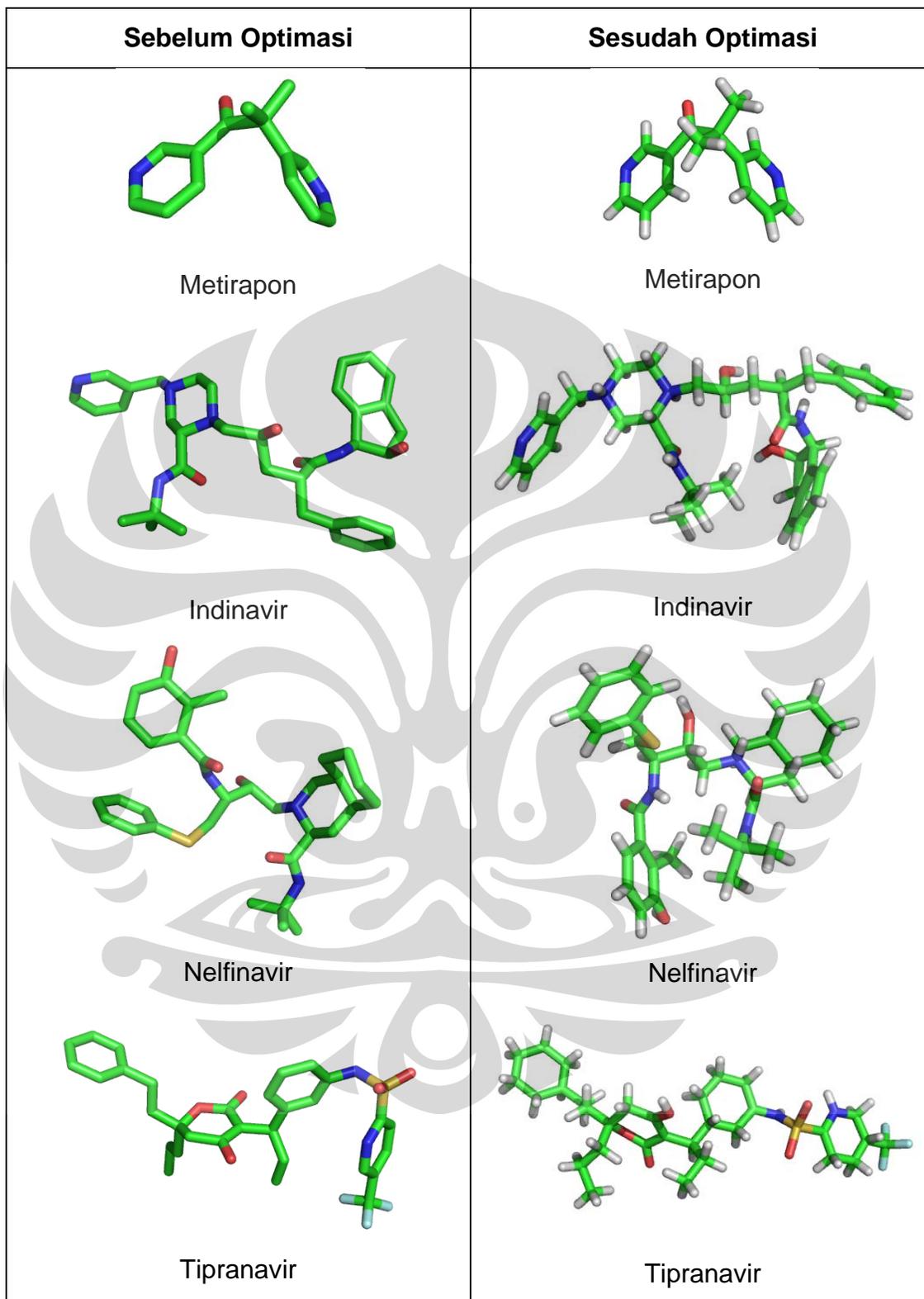
Gambar 15. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara *trust*



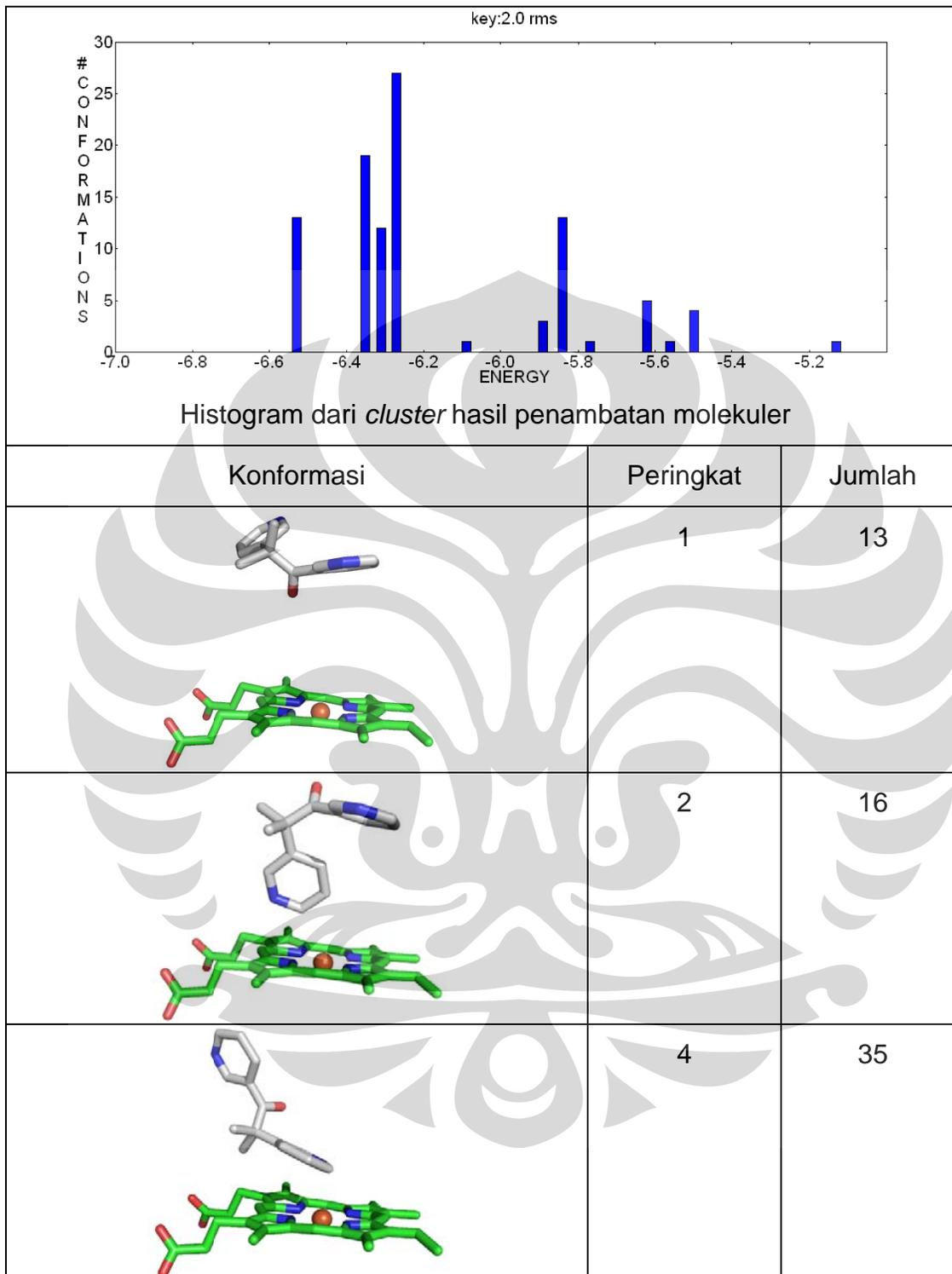
Gambar 16. Gugus heme pada 1TQN yang diminimisasi secara *trust* dan mempertahankan konformasi gugus heme



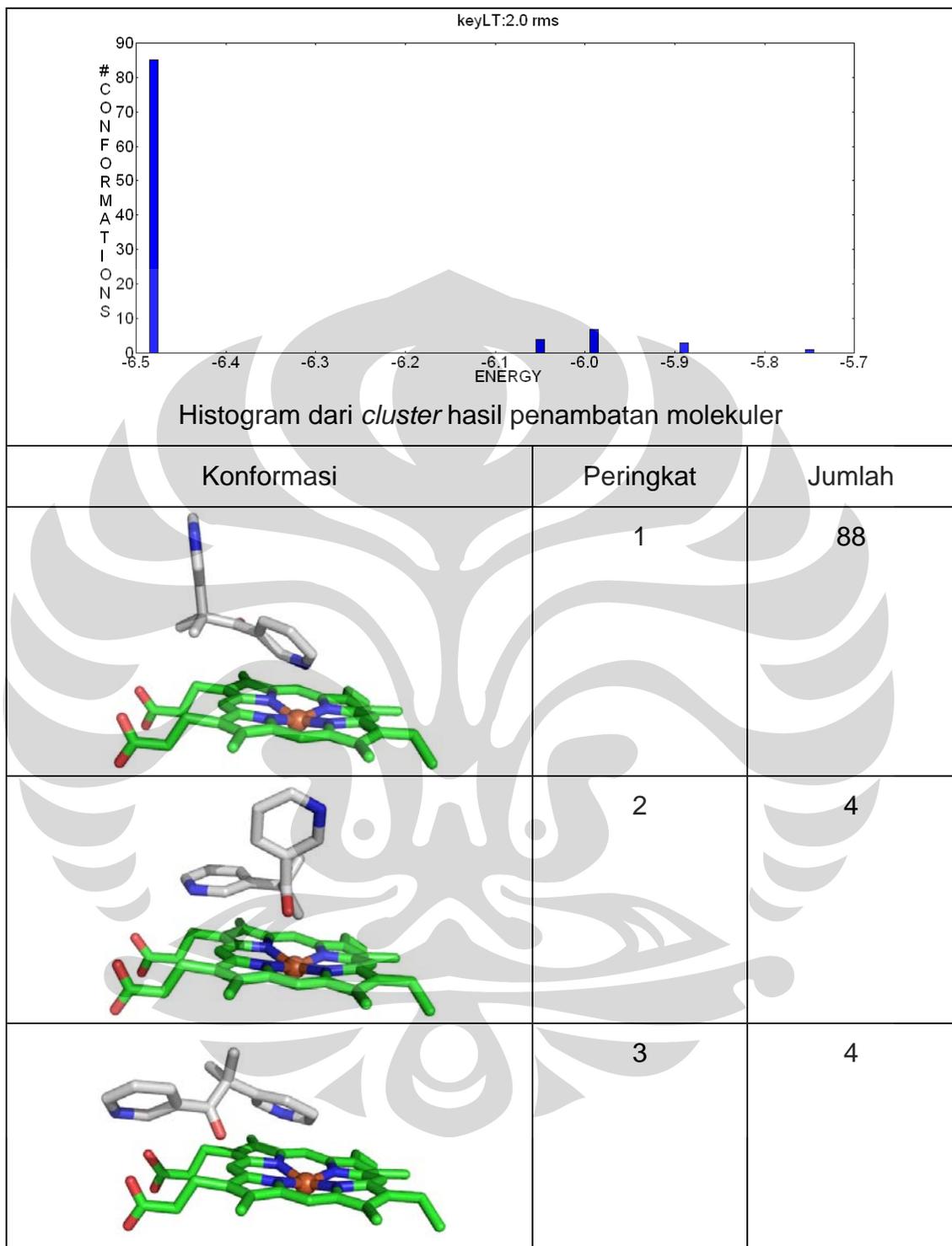
Gambar 17. Posisi metirapon terhadap heme pada kristal CYP3A4 dengan identitas PDB 1W0G



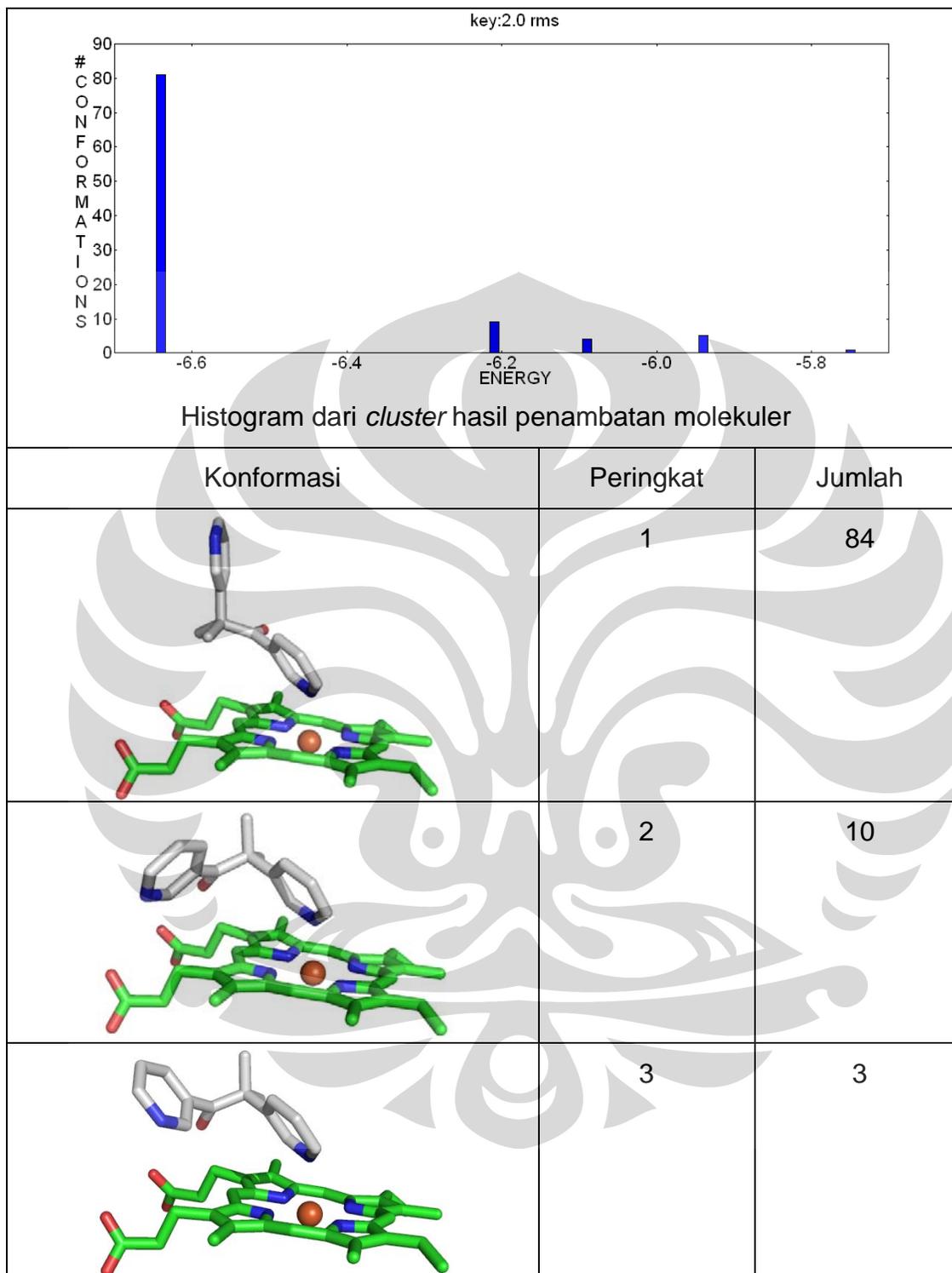
Gambar 18. Hasil optimasi ligan untuk penambatan molekuler pada 1TQN



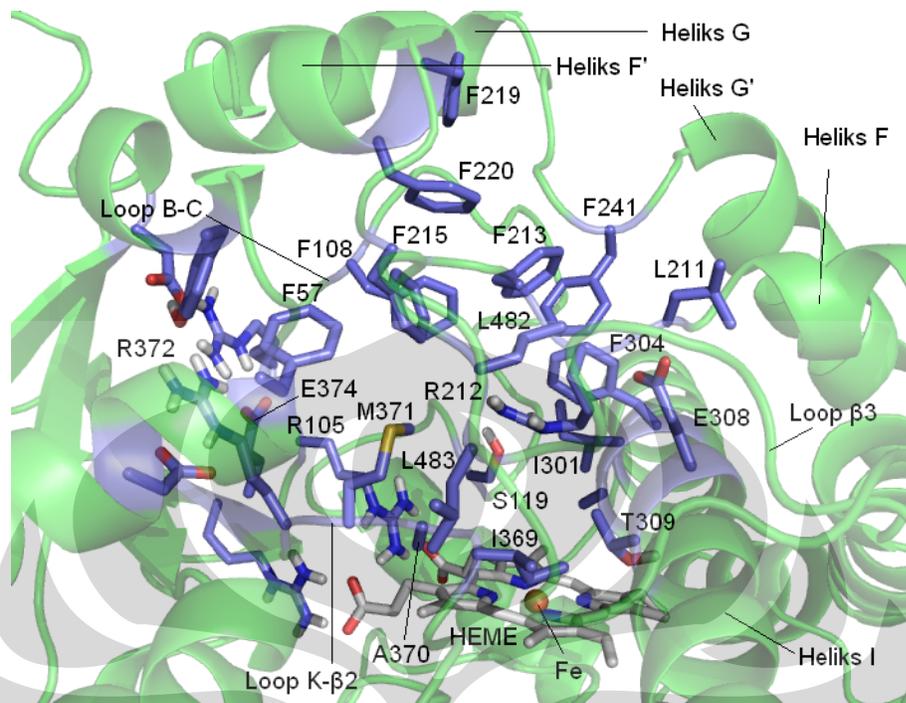
Gambar 19. Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi



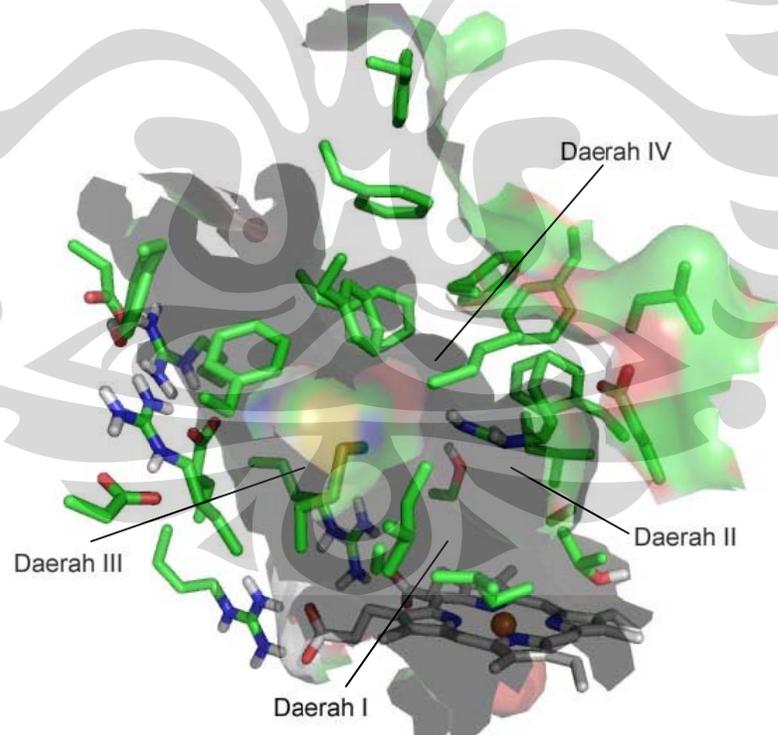
Gambar 20. Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi *trust*



Gambar 21. Hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi *trust* dengan mempertahankan gugus heme

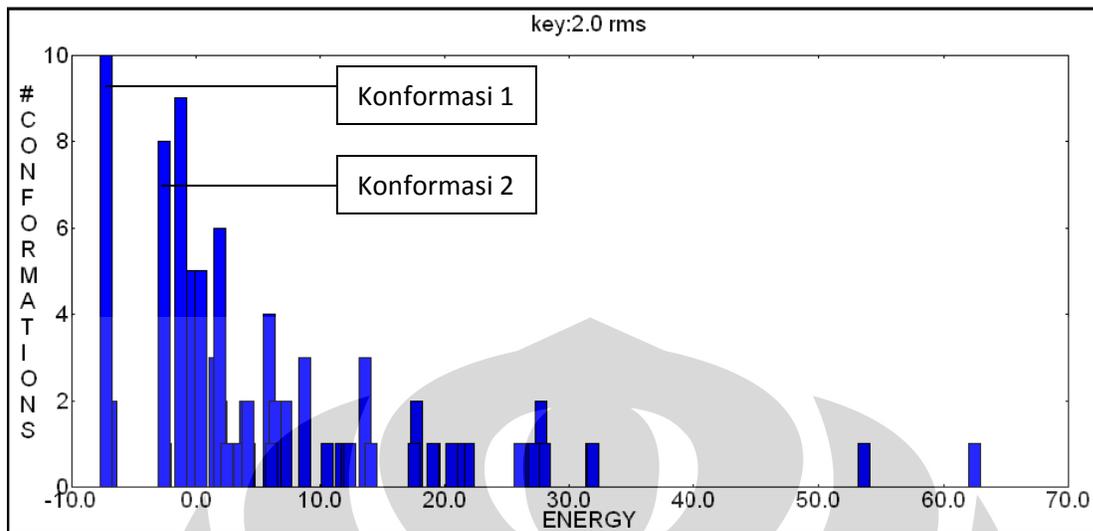


(a)

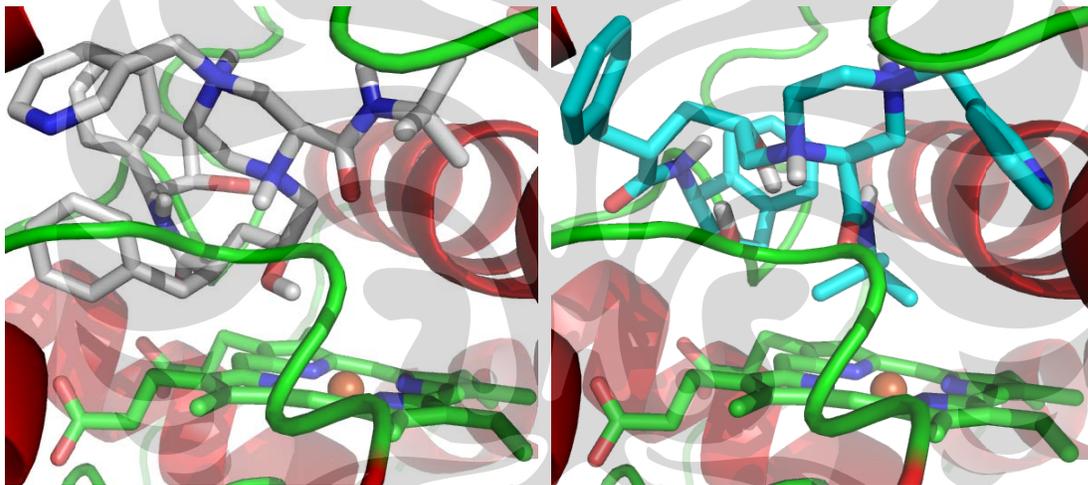


(b)

Gambar 22. Situs aktif sitokrom P450 3A4 (1TQN): rantai samping residu yang berperan dalam warna ungu (a); empat daerah hidrofobik (b)



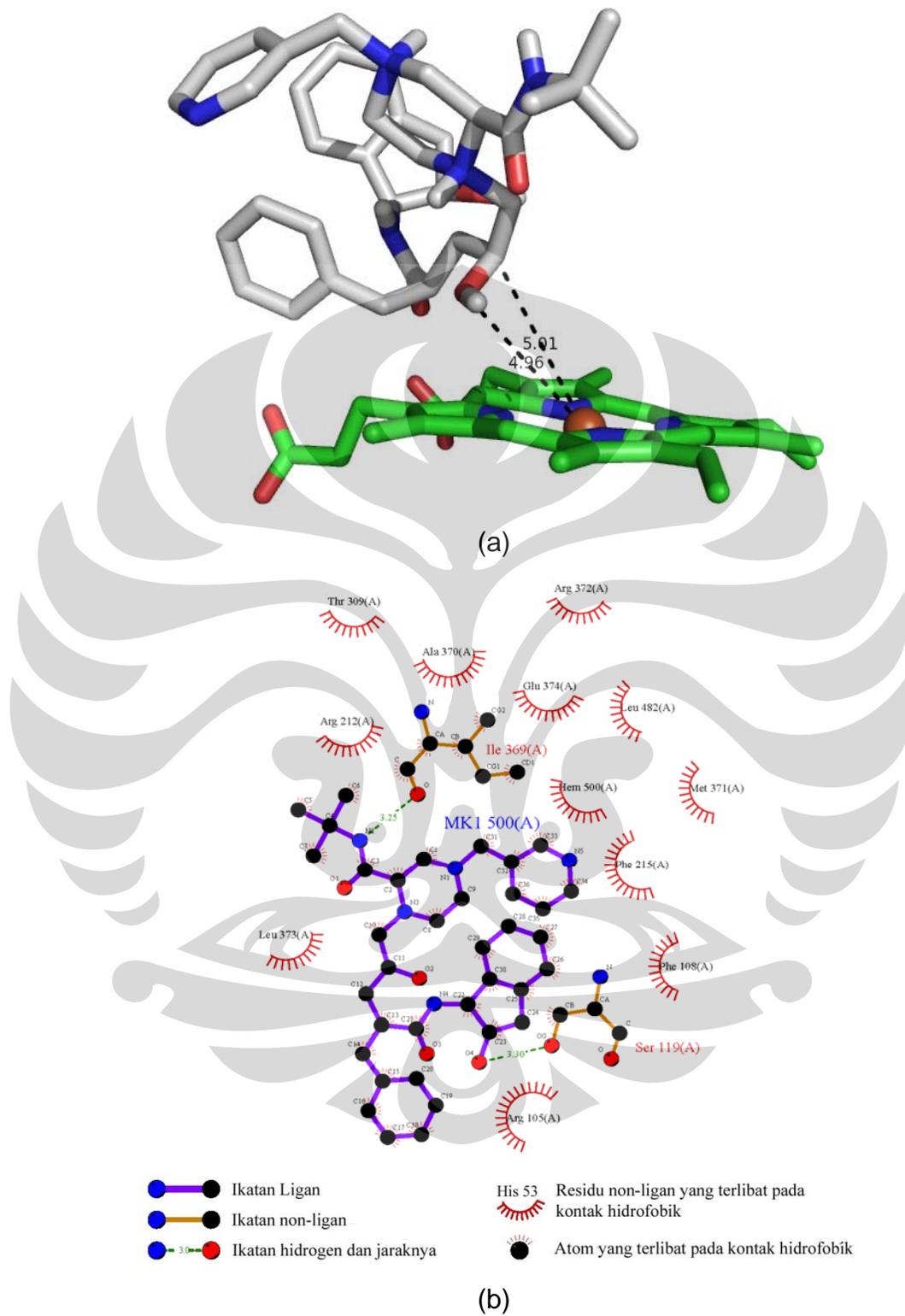
(a)



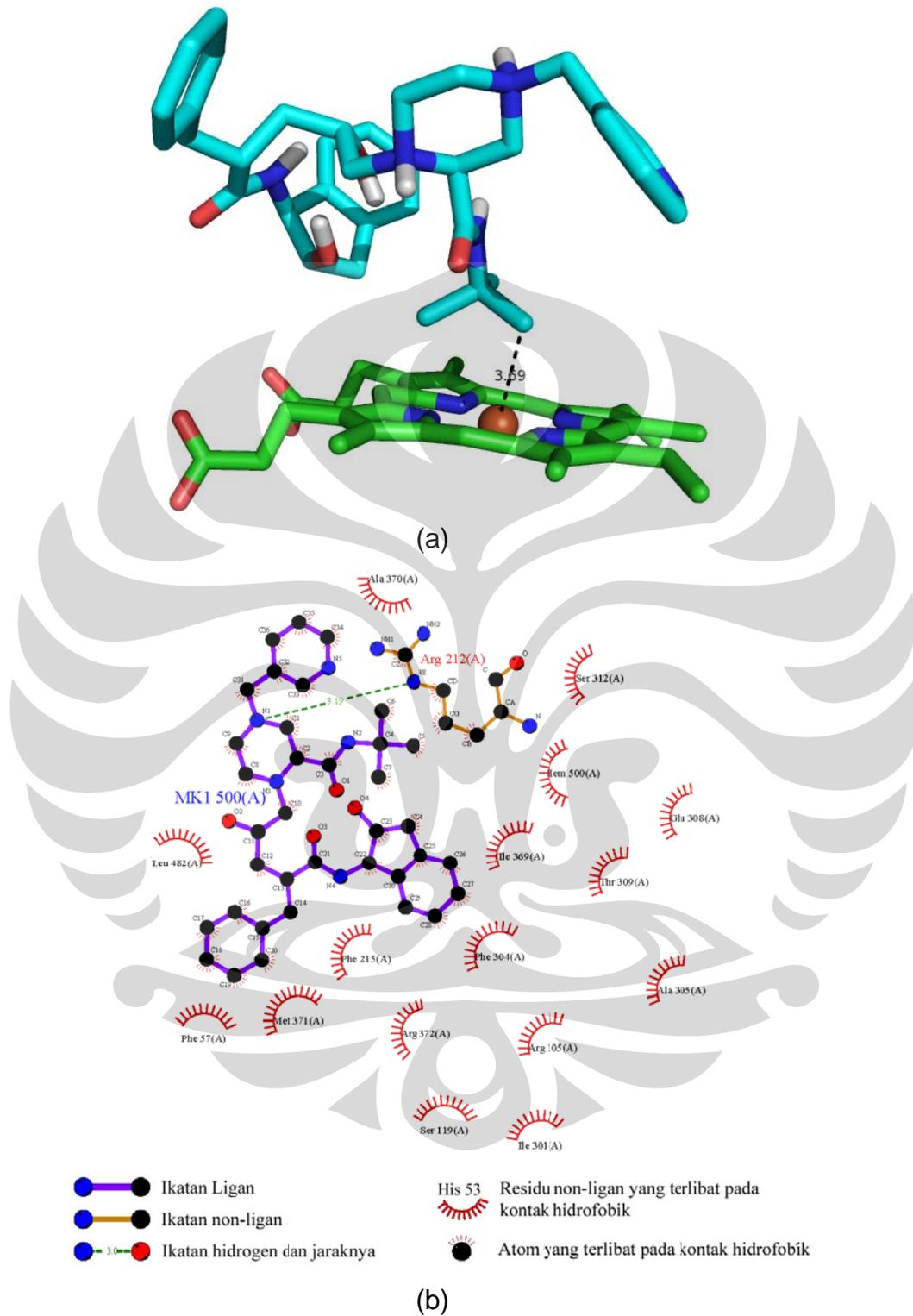
(b)

(c)

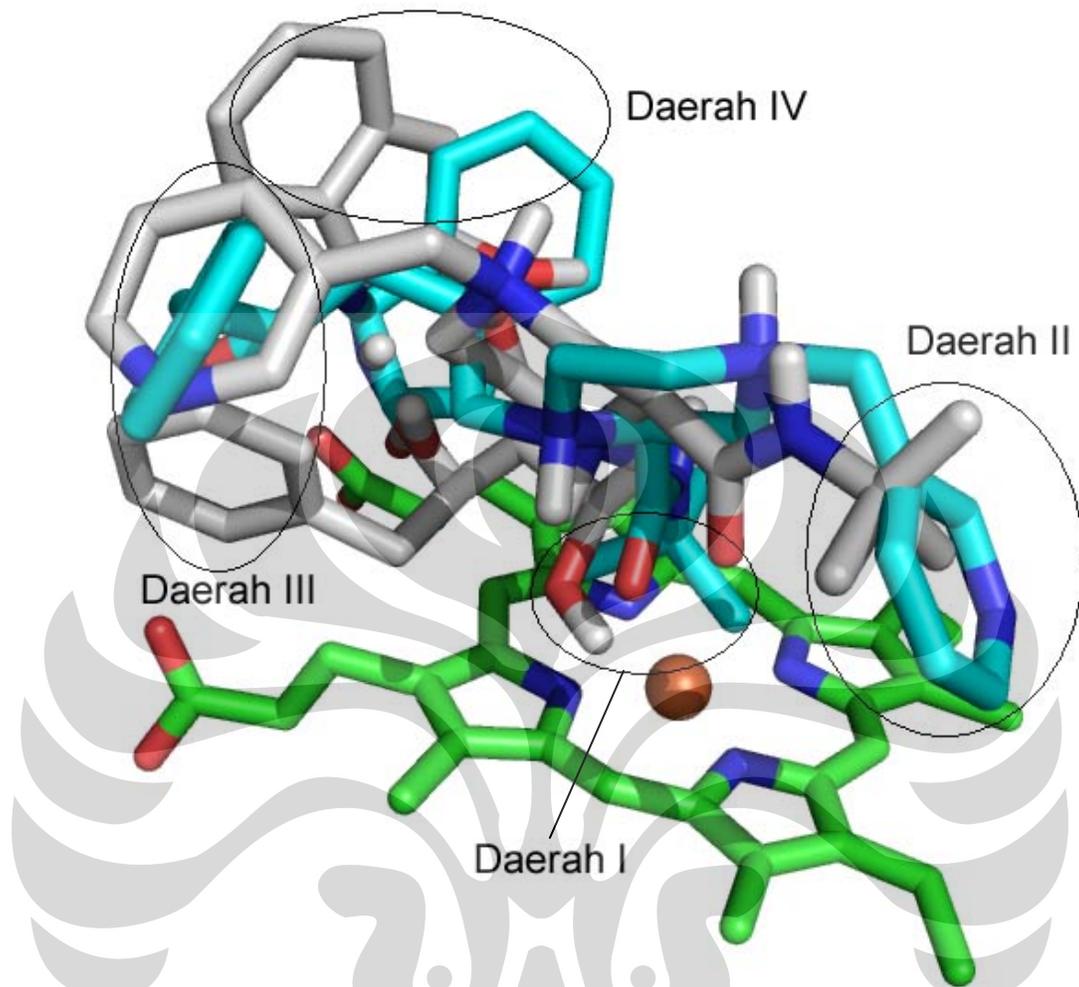
Gambar 23. Histogram hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); dan 2 (c) hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN



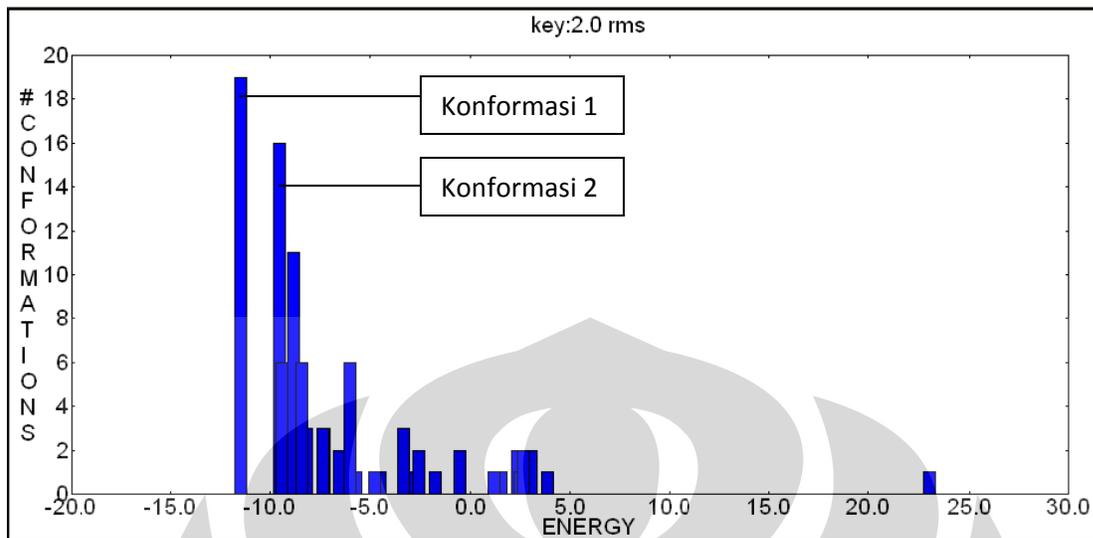
Gambar 24. Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



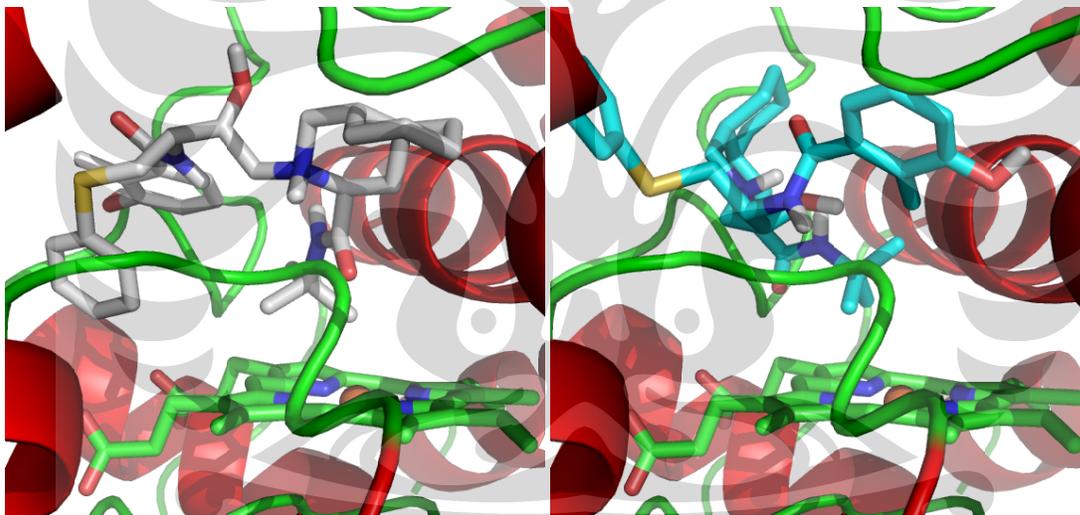
Gambar 25. Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



Gambar 26. Superposisi konformasi 1 (putih) dan 2 (sian) hasil penambatan molekuler indinavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik



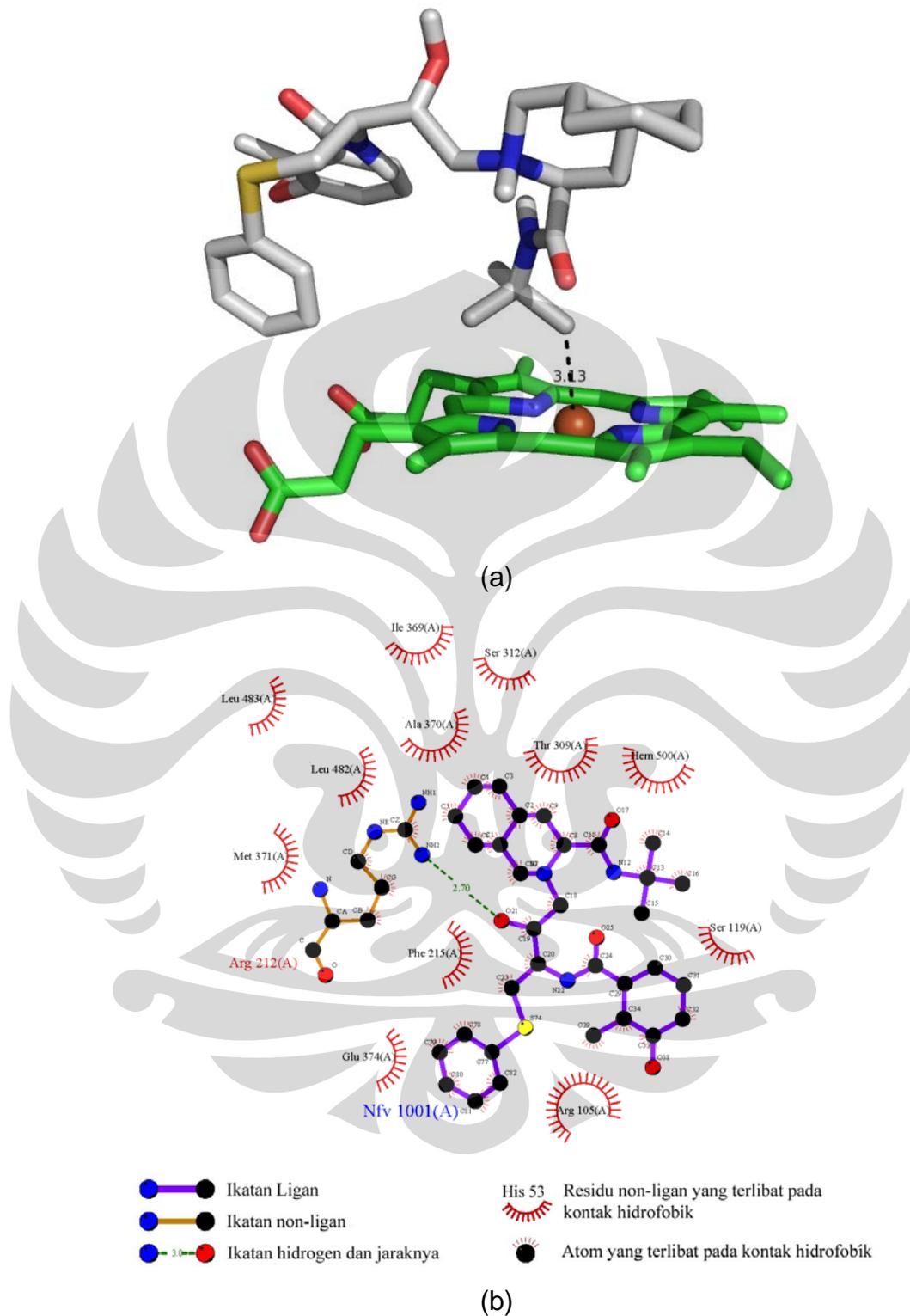
(a)



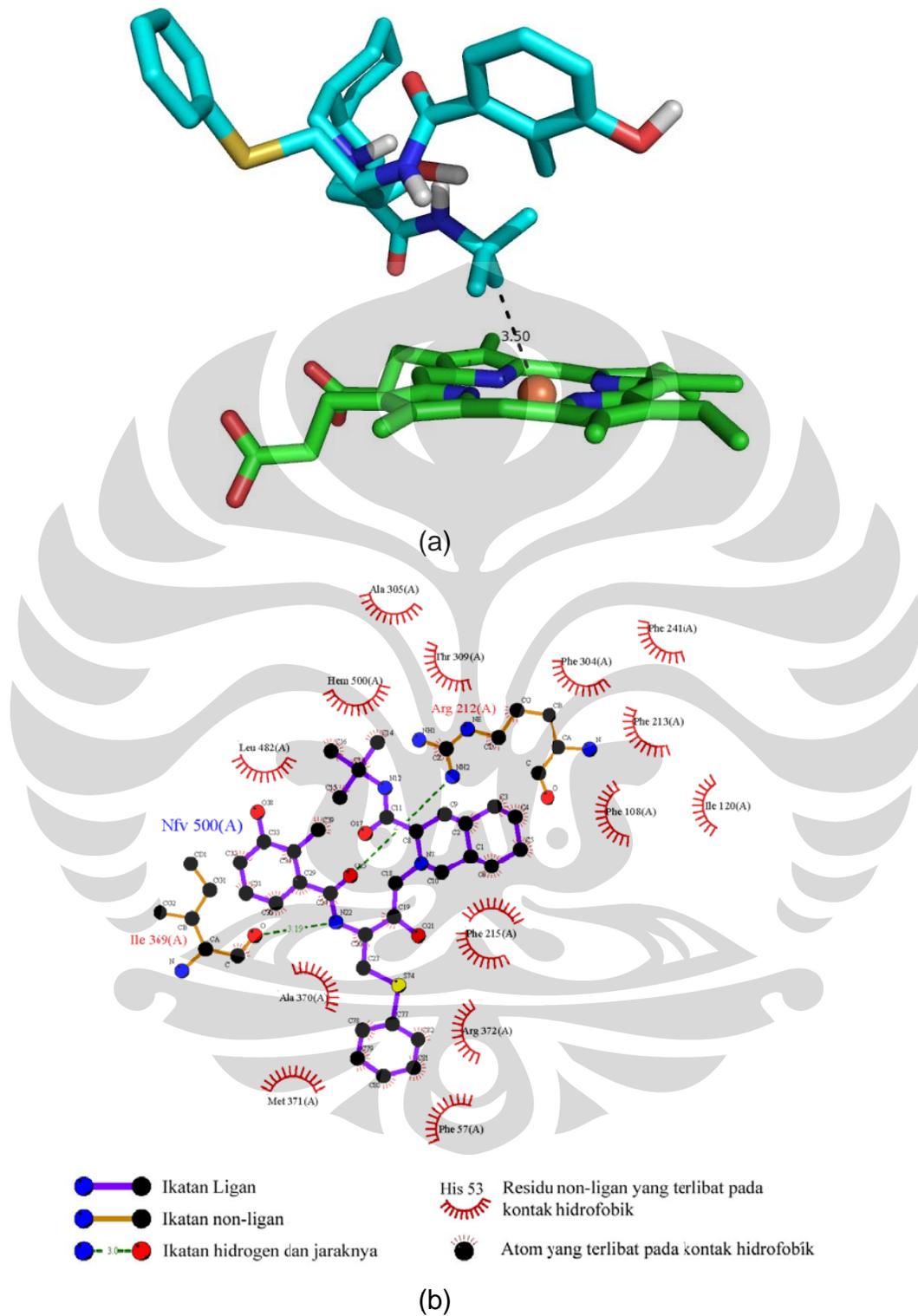
(b)

(c)

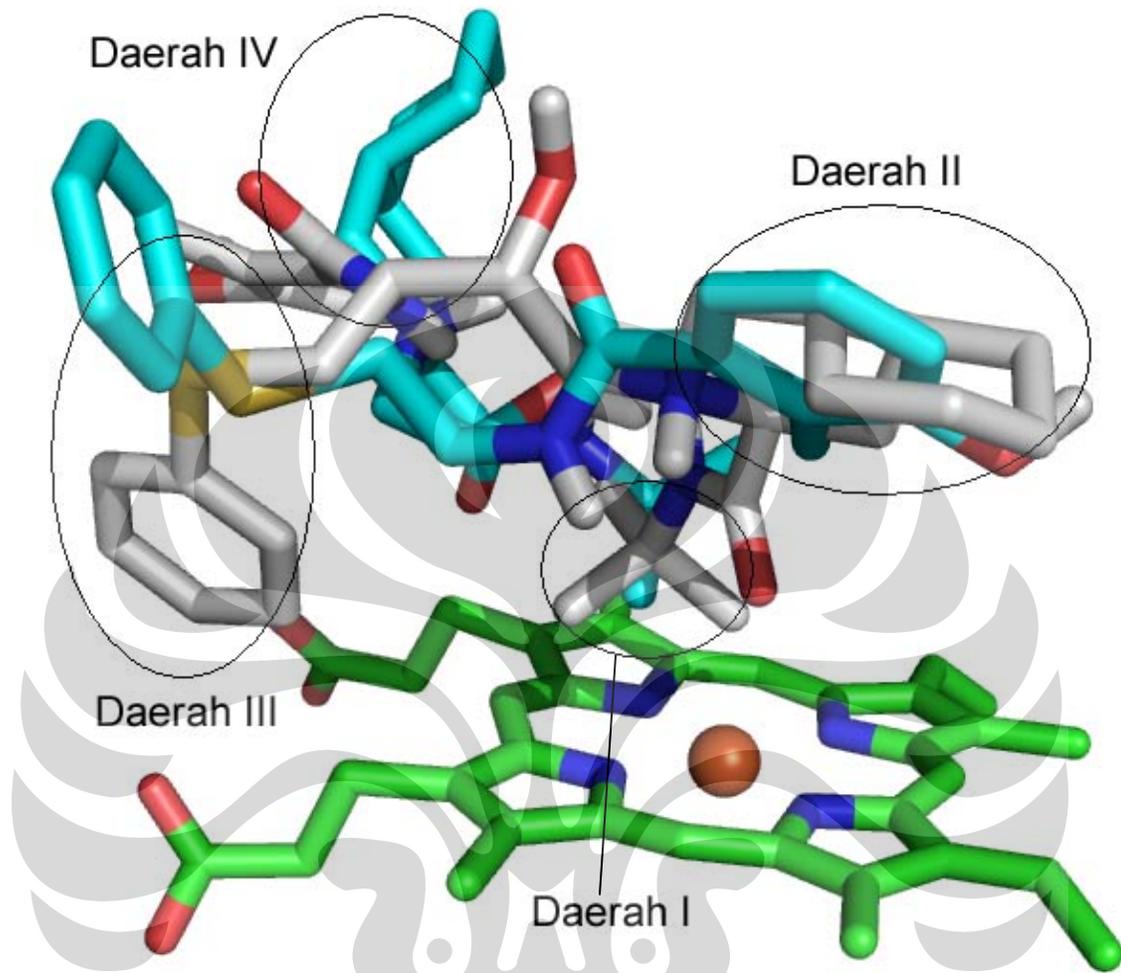
Gambar 27. Histogram hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); dan 2 (c) hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN



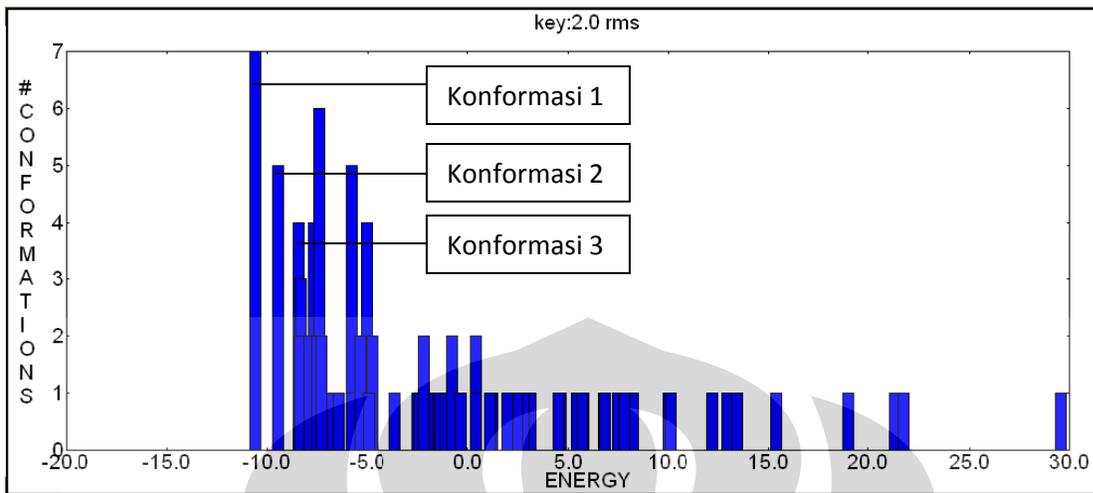
Gambar 28. Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



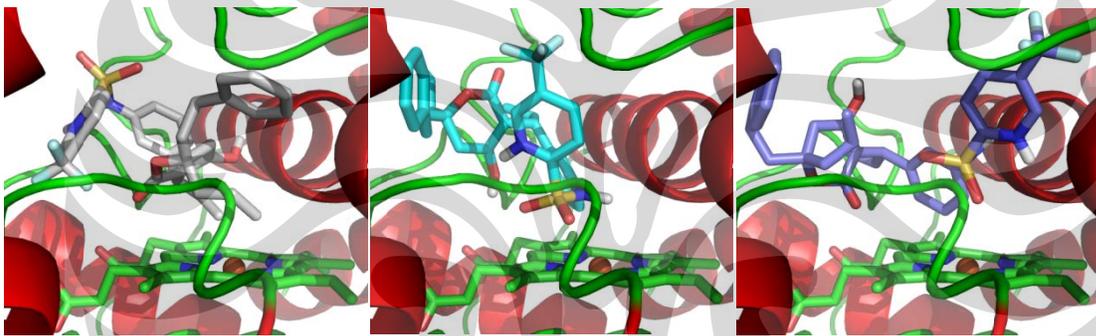
Gambar 29. Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



Gambar 30. Superposisi konformasi 1 (putih) dan 2 (sian) hasil penambatan molekuler nelfinavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik



(a)

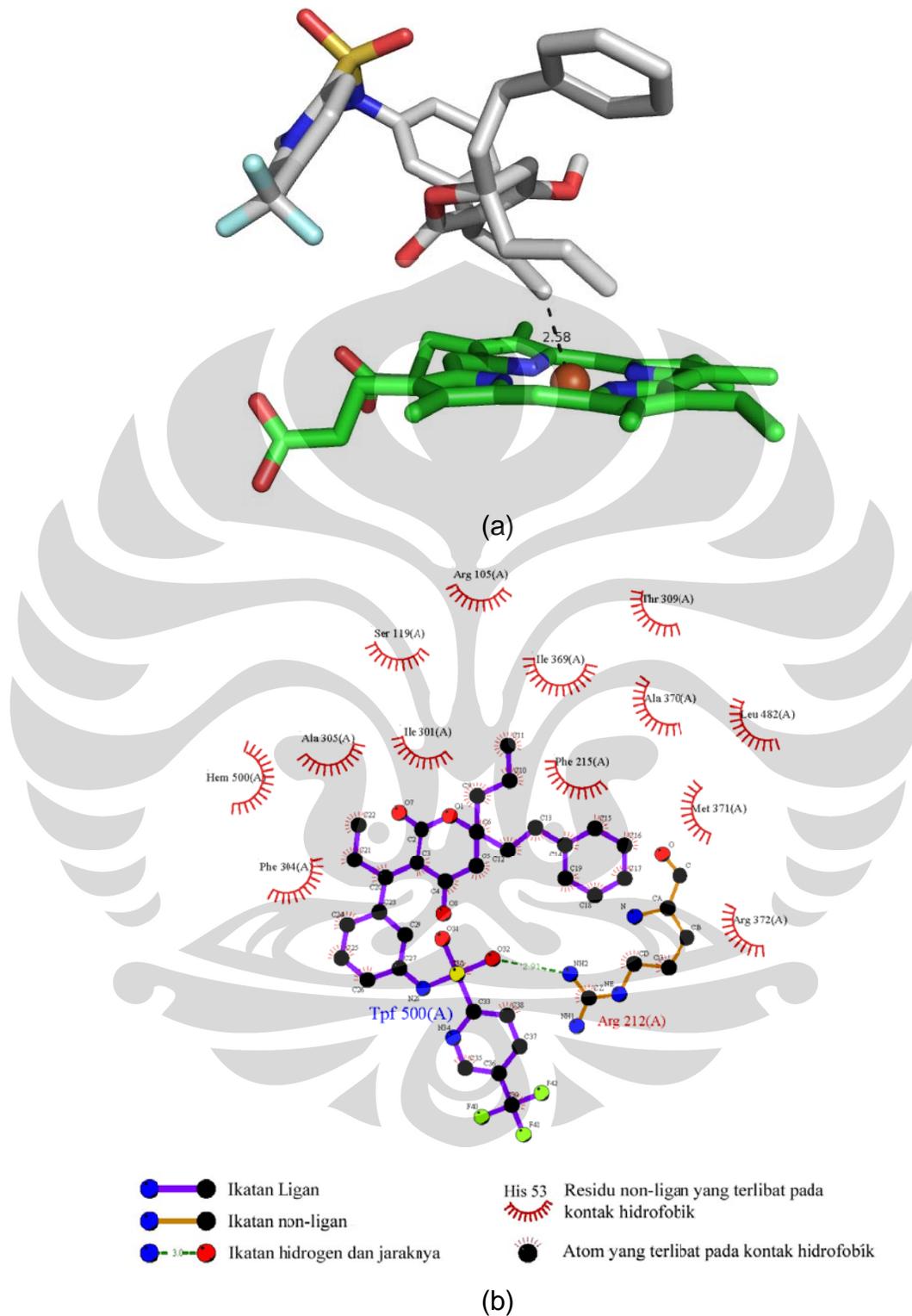


(b)

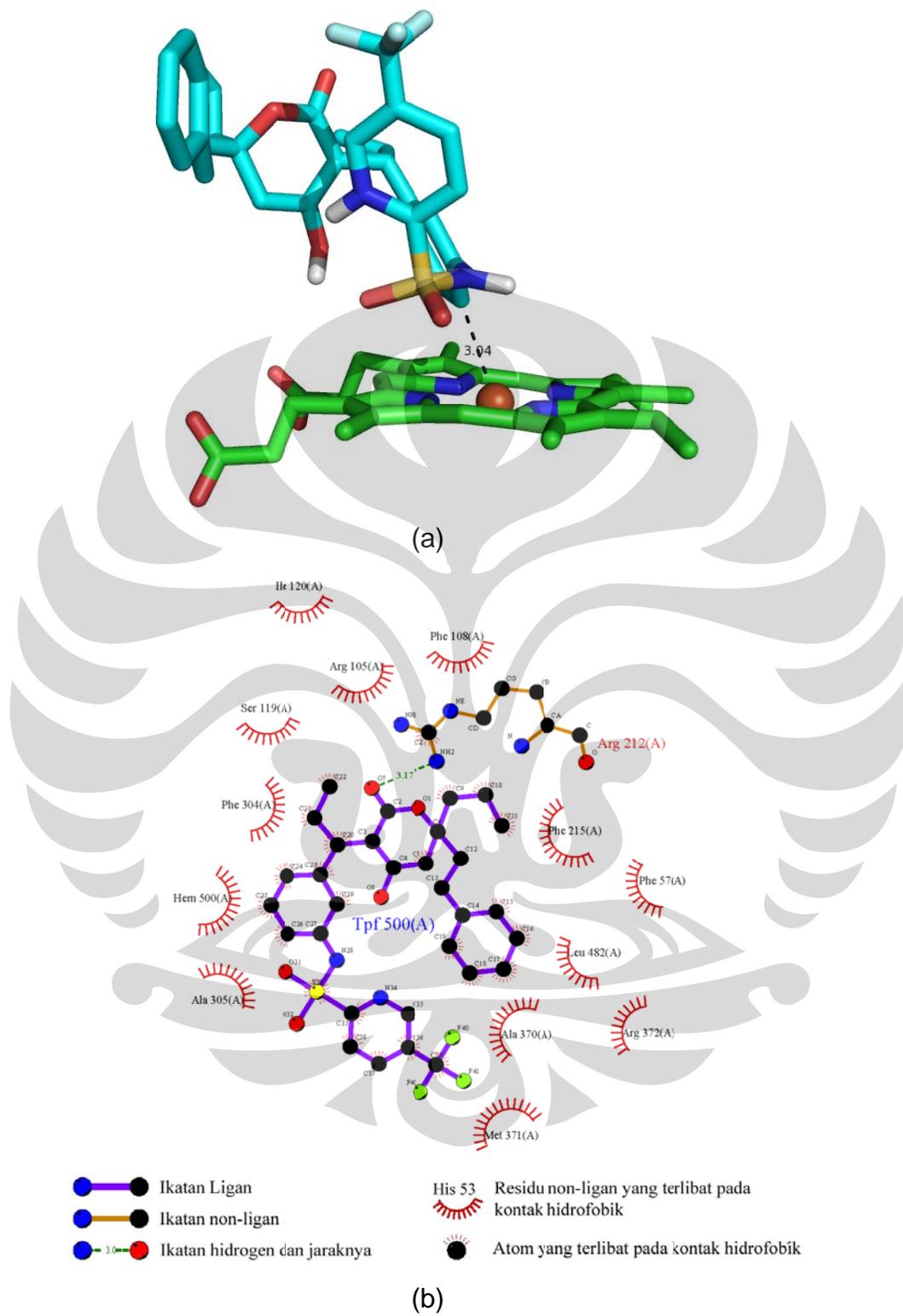
(c)

(d)

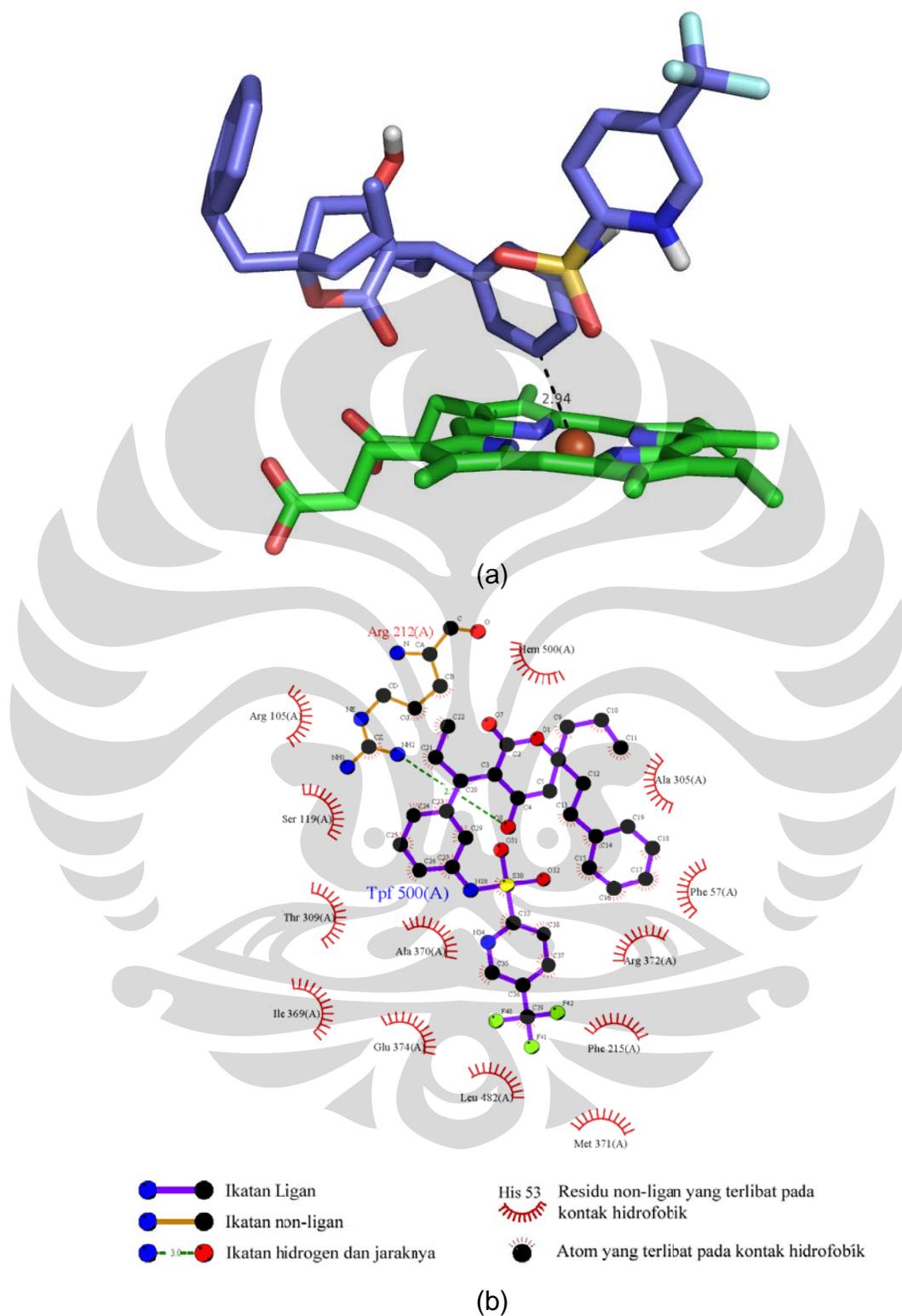
Gambar 31. Histogram hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN (a); serta konformasi 1 (b); 2 (c); dan 3 (d) hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN



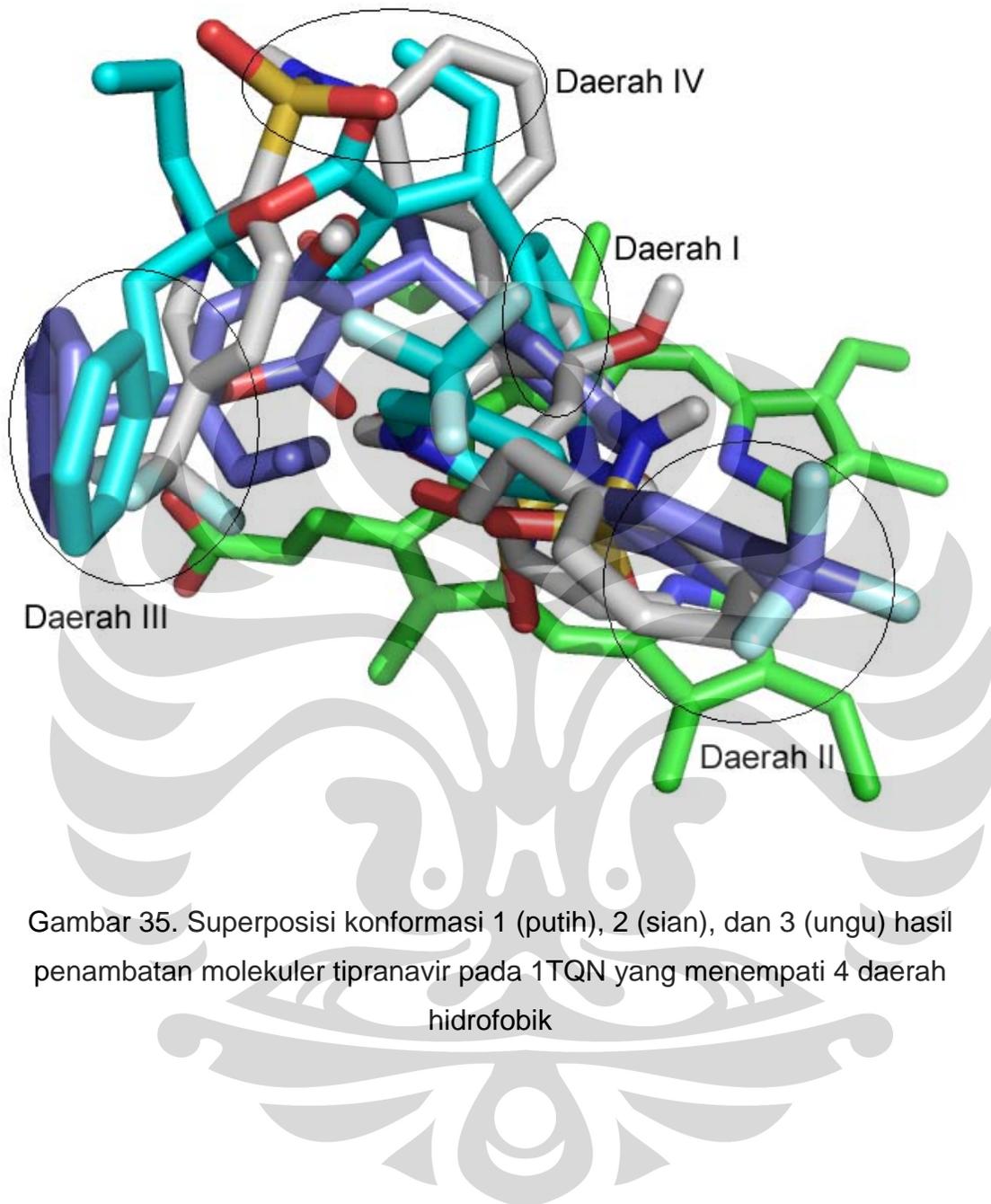
Gambar 32. Interaksi konformasi 1 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



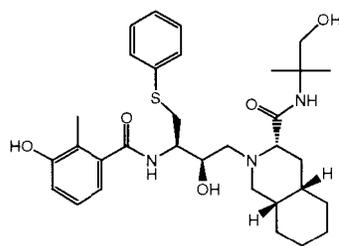
Gambar 33. Interaksi konformasi 2 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



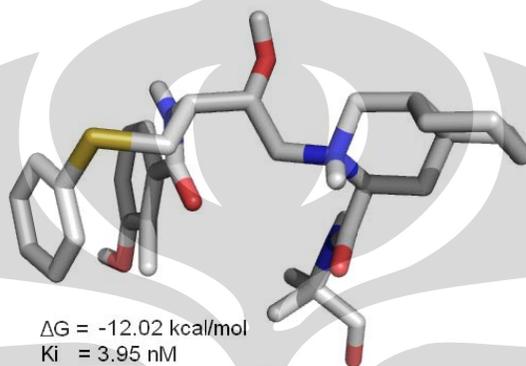
Gambar 34. Interaksi konformasi 3 hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN dengan Fe heme (a); dan residu asam amino (b)



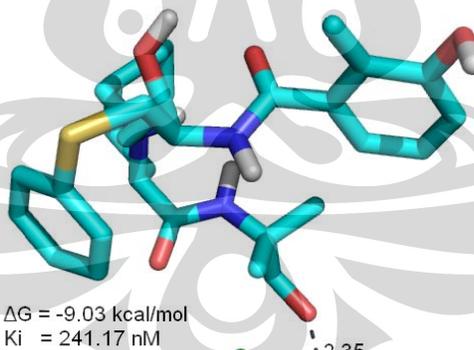
Gambar 35. Superposisi konformasi 1 (putih), 2 (sian), dan 3 (ungu) hasil penambatan molekuler tipranavir pada 1TQN yang menempati 4 daerah hidrofobik



(a)

 $\Delta G = -12.02 \text{ kcal/mol}$
 $K_i = 3.95 \text{ nM}$

(b)

 $\Delta G = -9.03 \text{ kcal/mol}$
 $K_i = 241.17 \text{ nM}$

(c)

Gambar 36. Metabolit M8 dari nelfinavir (a); Konformasi 1 (b), dan 2 (c) hasil penambatan molekuler metabolit antara M8 dari nelfinavir pada 1TQN



Tabel 1. Kondisi dan kualitas CYP3A4 yang terdapat pada PDB

PDB	Resolusi (Å)	Subunit	Ligan	Daerah terputus
1TQN	2.05	A	HEM	282-285
1W0E	2.80	A	HEM	261-270, 277-290
1W0F	2.65	A	HEM, progesteron	262-268, 281-289
1W0G	2.73	A	HEM, metirapon	263-269, 277-288
2J0D	2.75	A, B	HEM, eritromisin	196-197, 214-218, 261-270, 277-290
2V0M	3.80	A, B, C, D	HEM, ketokonazol	264-268, 280-289

Tabel 2. Jumlah *Gasteiger Charges* yang ditambahkan dan jumlah torsi fleksibel inhibitor HIV-Protease pada proses optimasi ligan

Inhibitor HIV-Protease	<i>Gasteiger Charges</i>	Jumlah torsi fleksibel
Amprenavir	0.00	11
Atazanavir	0.00	18
Darunavir	0.00	11
Fosamprenavir	0.00	16
Indinavir	2.00	8
Lopinavir	0.00	14
Nelfinavir	1.00	9
Ritonavir	0.00	16
Saquinavir	1.00	13
Tipranavir	0.00	8

Tabel 3. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (uM)	Jumlah posisi
1	1	-6.53	16.35	13
	2	-6.35	22.19	19
	3	-6.31	23.76	12
	4	-6.27	25.54	27
	5	-6.09	34.59	1
	6	-5.89	48.39	3
	7	-5.84	52.82	13
	8	-5.77	59.23	1
	9	-5.62	75.85	5
	10	-5.56	83.86	1
	11	-5.5	93.19	4
	12	-5.13	174.12	1
2	1	-6.39	20.61	15
	2	-6.33	22.85	13
	3	-6.2	28.41	7
	4	-6.17	29.86	40
	5	-5.88	49.13	13
	6	-5.79	56.6	6
	7	-5.73	62.57	1
	8	-5.62	76.48	1
	9	-5.48	96.01	2
	10	-5.37	115.87	1
	11	-5.3	130.9	1

Tabel 3. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang tidak mengalami minimisasi (Lanjutan)

3	1	-6.32	23.27	10
	2	-6.29	24.65	17
	3	-6.25	26.4	38
	4	-6.16	30.59	2
	5	-6.11	33.23	14
	6	-5.89	48.3	9
	7	-5.82	54.29	2
	8	-5.75	60.93	3
	9	-5.69	67.12	1
	10	-5.52	90.22	1
	11	-5.48	95.93	1
	12	-5.41	107.53	1

Tabel 4. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode *trust*

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (μ M)	Jumlah posisi
1	1	-6.52	16.62	89
	2	-6.02	38.36	6
	3	-5.93	45.03	2
	4	-5.87	49.94	1
	5	-5.74	61.8	1
	6	-5.39	112.15	1
2	1	-6.48	17.90	85
	2	-6.05	36.88	4
	3	-5.99	40.79	7
	4	-5.89	48.28	3
	5	-5.75	61.18	1
3	1	-6.49	17.54	91
	2	-6.01	39.48	2
	3	-5.99	40.59	3
	4	-5.99	40.92	4

Tabel 5. Data hasil penambatan molekuler metirapon pada 1TQN yang mengalami minimisasi dengan metode *trust* tetapi dengan mempertahankan gugus heme

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (μ M)	Jumlah posisi
1	1	-6.64	13.6	81
	2	-6.21	28.21	9
	3	-6.09	34.29	4
	4	-5.94	44.38	5
	5	-5.75	61.41	1
2	1	-6.67	12.88	84
	2	-6.22	27.7	7
	3	-6.09	34.35	3
	4	-5.96	42.99	5
	5	-5.66	70.4	1
3	1	-6.63	13.78	86
	2	-6.17	30.14	13
	3	-5.95	43.52	1

Tabel 6. Data *cluster* dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler

indinavir pada 1TQN

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (μ M)	Jumlah posisi	Konformasi
1	1	-6.83	9.92	1	1
	2	-6.33	23.08	9	2
	3	-5.86	50.59	6	1
	4	-3.31	3740	3	
	5	-2.75	9680	8	
2	1	-7.21	5.15	10	1
	2	-6.83	9.86	2	
	3	-2.56	13270	8	2
	5	-1.19	133410	9	
	6	-0.39	515350	5	
3	1	-7.57	2.84	7	1
	2	-7.12	6.07	8	2
	3	-5.94	44.32	8	
	4	-4.2	836.17	13	
	5	-3.6	2290	3	
	6	-3.29	3870	7	

Tabel 7. Data *cluster* dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler

nelfinavir pada 1TQN

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (uM)	Jumlah posisi	Konformasi
1	1	-11.83	0.00214	20	1
	2	-10	0.04644	8	
	3	-9.88	0.05698	13	2
	4	-9.73	0.07416	7	
	5	-7.81	1.9	1	
2	1	-11.5	0.00369	19	1
	2	-9.54	0.10176	16	2
	3	-9.44	0.12034	6	
	4	-8.87	0.31755	11	
	5	-8.42	0.66951	6	
3	1	-11.7	0.00264	16	1
	2	-10.2	0.03364	5	2
	3	-9.48	0.11224	5	
	4	-9.06	0.23008	9	
	5	-8.66	0.45133	1	
	6	-8.65	0.45857	7	
	7	-7.61	2.63	9	

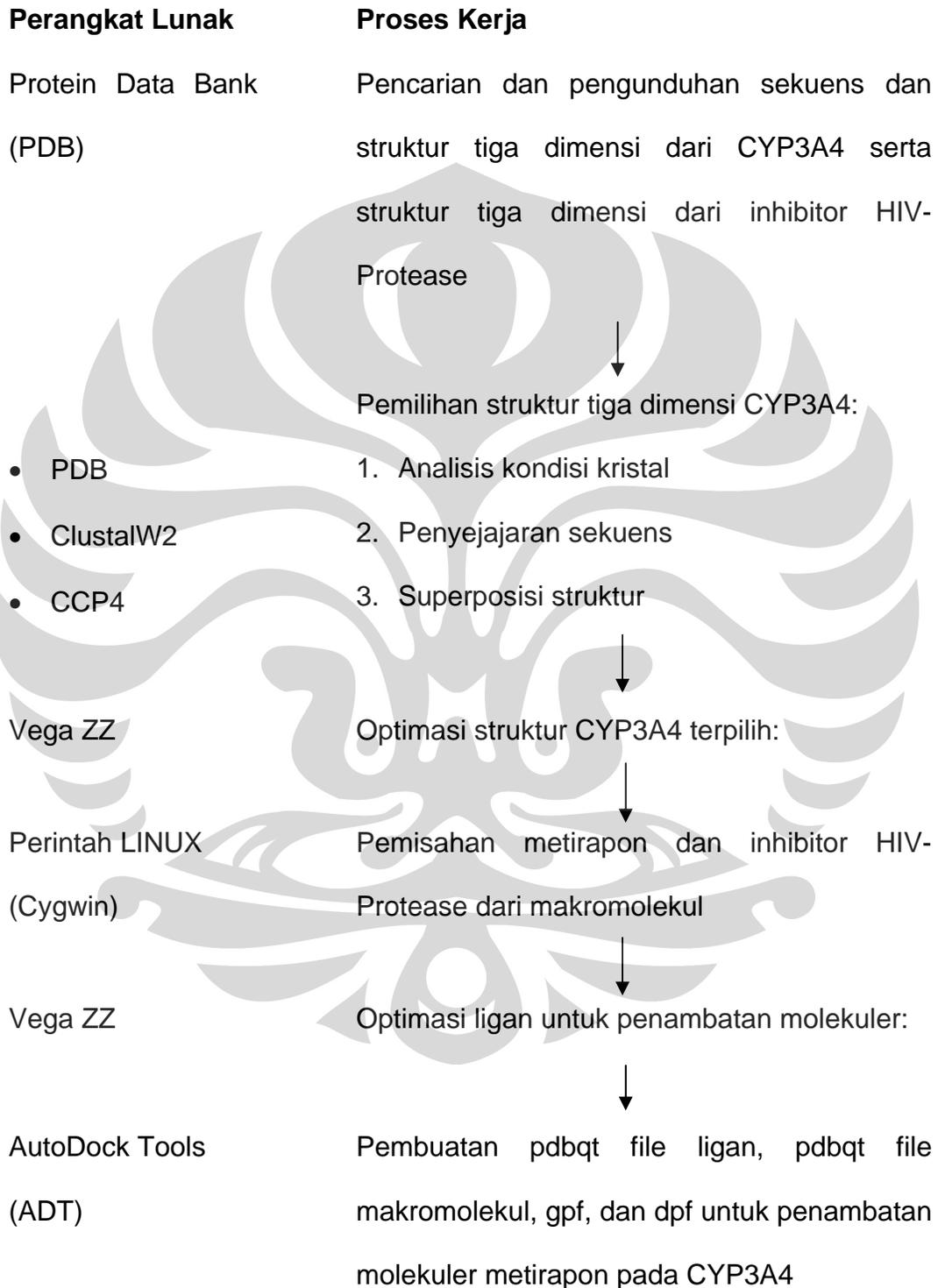
Tabel 8. Data *cluster* dan peringkat terbaik hasil penambatan molekuler

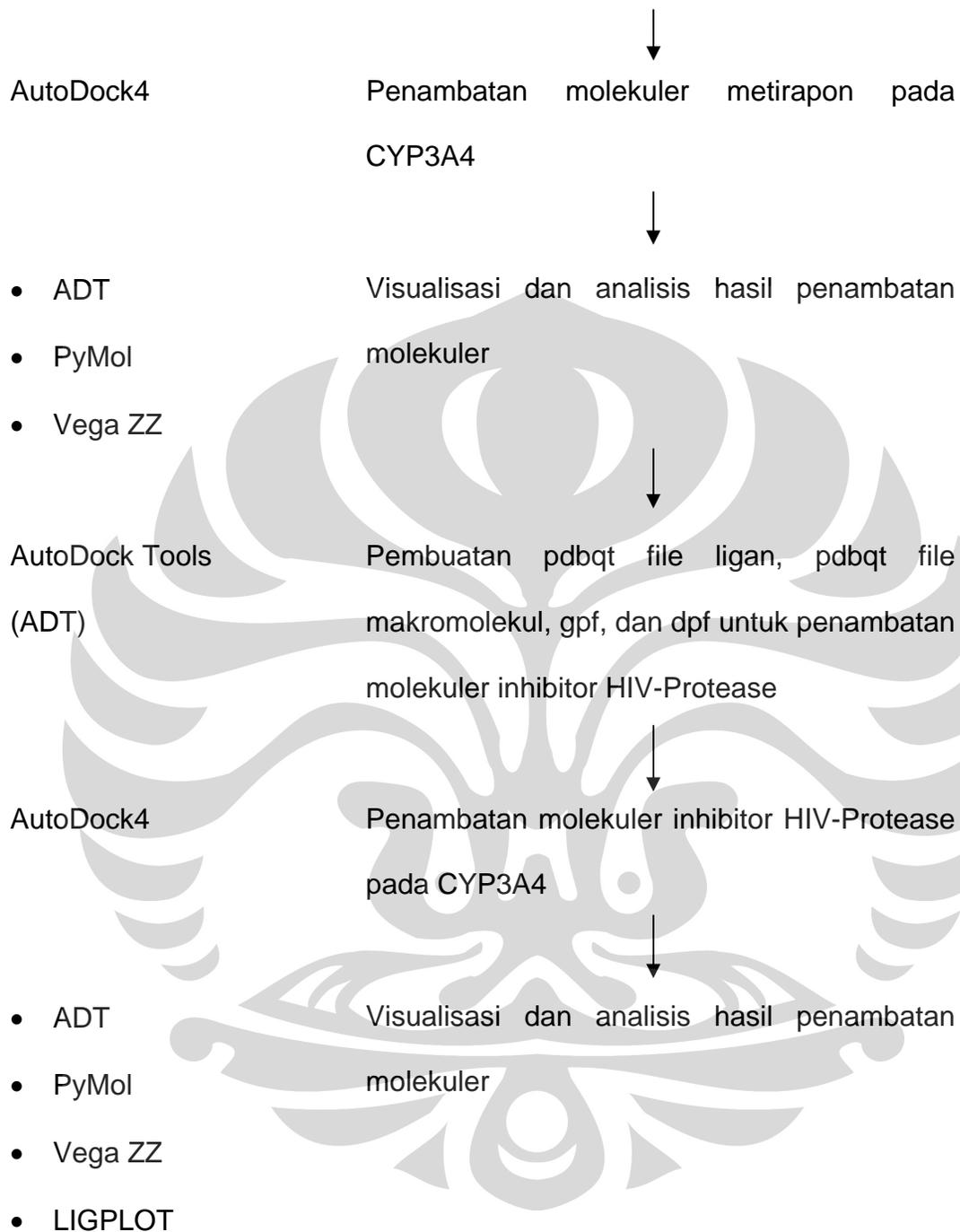
Tipranavir pada 1TQN

<i>Docking</i> ke-	Peringkat <i>cluster</i>	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Ki (μ M)	Jumlah posisi	Konformasi
1	1	-9.54	0.10247	6	1
	2	-8.9	0.30123	4	3
	5	-8.01	1.33	7	
	6	-7.94	1.52	5	
	7	-7.71	2.21	3	
	8	-7.4	3.77	5	
	9	-7.22	5.07	6	
	10	-6.93	8.33	3	
	18	-3.86	1470	3	
	2	1	-10.6	0.01697	7
2		-9.46	0.11682	2	2
3		-9.45	0.1183	5	3
4		-8.43	0.65669	4	
6		-8.36	0.75055	3	
8		-7.69	2.32	4	
10		-7.4	3.77	6	
14		-5.82	54.1	5	
18		-5.08	189.03	4	
3		1	-9.85	0.06066	3
	2	-9.66	0.08331	2	2
	3	-9.45	0.11789	4	3
	8	-7.33	4.26	4	
	9	-7.14	5.83	5	
	13	-5.83	53.22	5	

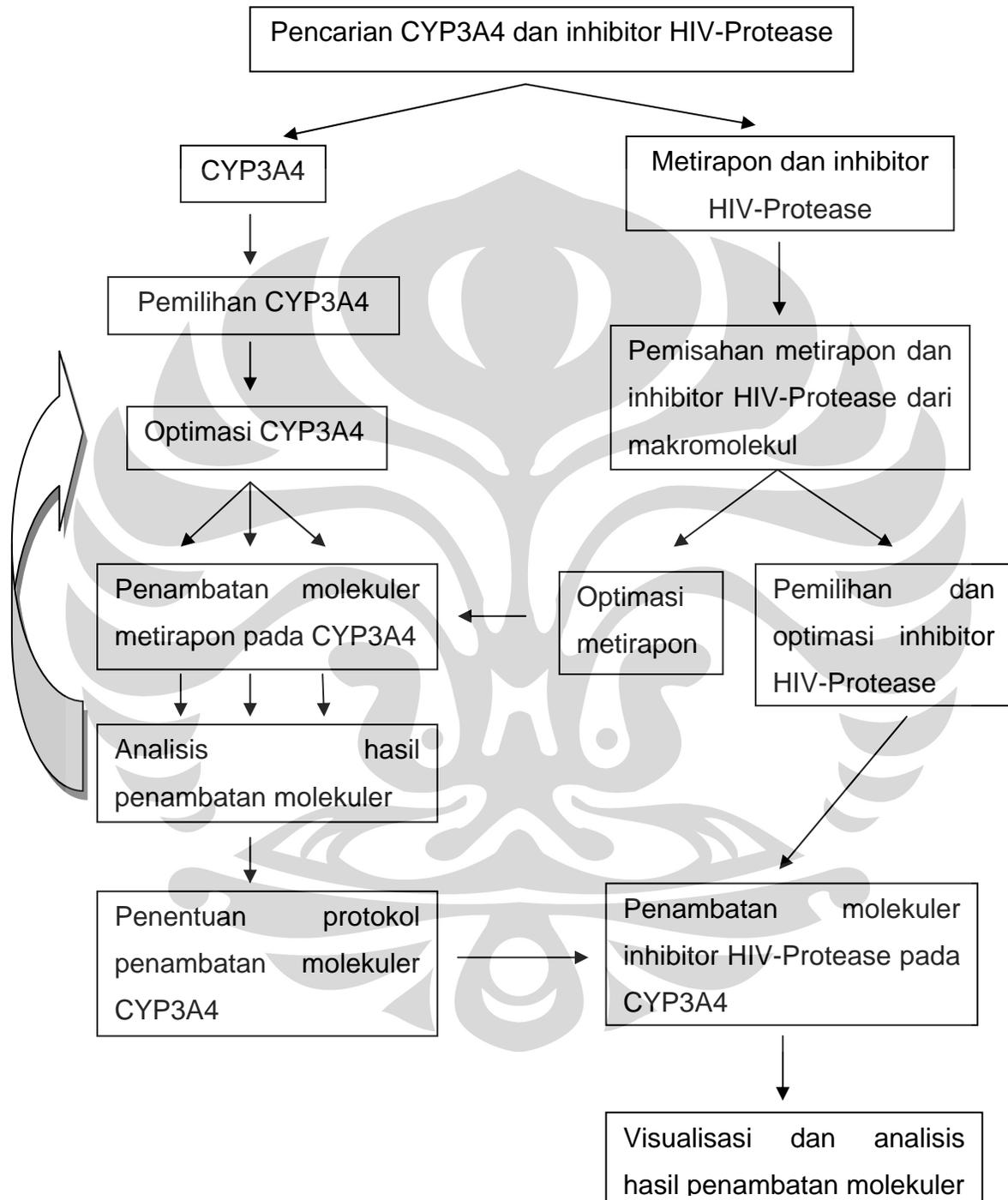


Lampiran 1. Urutan tahap cara kerja penelitian dan program yang digunakan





Lampiran 2. Skema cara kerja penelitian



Lampiran 3. Perintah LINUX yang digunakan pada penelitian ini

1. `cd ..`
= menaikkan direktori satu tingkat
2. `cd nama_folder`
= masuk atau pindah direktori pada satu tingkat
3. `cat nama_file.pdb | grep identitas_ligan > nama_ligan.pdb`
= mengambil ligan dari kompleks ligan-makromolekul
4. `cat nama_file.pdb | grep -v identitas_ligan > nama_makromolekul.pdb`
= mengambil makromolekul dari kompleks ligan-makromolekul
5. `vi nama_file.pdbqt`
= membuka *log file*
6. `: wq`
= menutup *log file*
7. `autogrid4 -p grid_file.gpf -l grid_file.glg&`
= menjalankan program autogrid4 untuk memroses *grid_file*
8. `autodock4 -p dock_file.dpf -l dock_file.dlg&`
= menjalankan program autodock4 untuk memroses *dock_file*
9. `tail -f dock_file.dlg`
= mengikuti proses yang sedang berlangsung
10. `ligplot nama_file.pdb identitas_ligan nomor_kode_ligan`
= menjalankan program ligplot

Lampiran 4. Hasil penyejajaran sekuens enam CYP3A4 pada PDB

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 49
2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 49
1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 49
1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 49
1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MAYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 49
1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE -
MALYGTSHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHKKYGKV 50
*****

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 99
2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 99
1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 99
1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 99
1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 99
1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
WGFYDGOQPVLAITDPDIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIA 100
*****

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 149
2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 149
1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 149
1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 149
1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 149
1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
EDEEWKRLRSLLSPTFTSGKCLKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPV 150
*****

```

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 199
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 199
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 199
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 199
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 199
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LKDVFGAYSMDVITSTSTSGVNIIDSLNPNQDPFVENTKKLLRFDFLDPFFL 200

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 249
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 249
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 249
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 249
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 249
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 SITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDF 250

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 299
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 299
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 299
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 299
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 299
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 LQLMIDSQNSKETESHKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYEL 300

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDITVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 349
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDITVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 349
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDITVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 349

1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDTVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 349
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDTVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 349
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 ATHPDVQQKLQEEIDAVLPNKAPPTYDTVLQMEYLDMMVNETLRLFP IAM 350

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 399
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 399
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 399
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 399
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 399
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 RLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLPERFSK 400

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 449
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 449
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 449
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 449
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 449
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 KNKDNIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFALMNMKLALIRVLQNF SFKPCKET 450

2J0D_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 485
 2V0M_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 485
 1W0G_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 485
 1W0F_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 485
 1W0E_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 485
 1TQN_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
 QIPLKLSLGGLLQPEKPVVLKVESRDGTVSGAHHHH 486

Lampiran 5. Tampilan situs *Protein Data Bank (PDB)* dan *ClustalW2*

RCSB PDB Protein Data Bank | Home

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

As of Tuesday Jun 16, 2009 there are 58236 Structures | PDB Statistics

WHAT'S NEW | CONTACT | FEEDBACK | HELP | PRINT

PDB ID or keyword Search ? Adv. Search

Home Search

- Home
- Getting Started
- Structural Genomics
- BioSync
- Electron Microscopy
- Download Files
- Deposit and Validate
- Dictionaries & File Formats
- Software Tools
- General Education
- General Information
- Acknowledgements
- Frequently Asked Questions

A Resource for Studying Biological Macromolecules

The PDB archive contains information about experimentally-determined structures of proteins, nucleic acids, and complex assemblies. As a member of the **wwPDB**, the RCSB PDB curates and annotates PDB data according to agreed upon standards.

The RCSB PDB also provides a variety of tools and resources. Users can perform simple and advanced searches based on annotations relating to sequence, structure and function. These molecules are visualized, downloaded, and analyzed by users who range from students to specialized scientists.

Molecule of the Month: Vaults

Our cells are filled with compartments, each performing a specific function. Some of these compartments, such as mitochondria and lysosomes, are very large and enclose many different molecular machines. Other intracellular compartments are smaller, such as the transport vesicles that shuttle proteins from site to site inside the cell. Most of these compartments, including mitochondria, lysosomes and transport vesicles, are surrounded by membranes. However, in special cases, cells build smaller compartments surrounded by a protein shell. In our own cells, vaults are a spectacular example of these protein-enclosed compartments.

■ Read more ... ■ Previous Features

PSI Featured Molecule: Hda and DNA Replication

When cells divide, they need to ensure that each daughter cell gets one copy of each chromosome. Bacteria contain one big circle of DNA, so they start replication in one place, then copy the DNA both ways around until it finishes on the other side. PSI Researchers have solved the first atomic structure at how bacteria use the Hda protein to initiate replication at this origin only once for each generation of the cell.

■ Read more from PSI SGKB ■ Previous Features

New user? Try the browser **compatibility check**, information on **Getting Started**, and see **What's New** on the site.

News

- Complete News
- Newsletter
- Discussion Forum
- Job Listings

16-June-2009
How does an HPUB structure get released?

An HPUB status indicates that a structure will be released when the primary reference is published. When it's confirmed that the corresponding article is available, the structure is included in the weekly update of the PDB.

The wwPDB receives publication dates and citation information directly from a few journals. For most articles, however, the wwPDB searches PubMed and scans the literature for publication information. Citations emailed to depos@wwpdb.org are also greatly appreciated.

More >>

Data Snapshots

Time-stamped yearly snapshots of the PDB archive are available via FTP at: <ftp://snapshots.wwpdb.org>

The snapshots provide readily identifiable data sets for research on the PDB archive.

www.pdb.org/pdb

EMBL-EBI EBI Search All Databases Enter Text Here Go

Databases Tools EBI Groups Training Industry About Us Help Site Index

Help Index # General Help # Formats # Gaps # Matrix # References # ClustalW2 Help # ClustalW2 FAQ # Jalview Help # Scores Table # Alignment # Guide Tree # Colours

Similar Applications

- Align
- Kalign
- MAFFT
- MUSCLE
- T-Coffee

ClustalW Programmatic Access

www.clustal.org

Clustal Related Literature

Search for Clustal related literature in Medline... [more](#)

EBI > Tools > Sequence Analysts > ClustalW2

ClustalW2

ClustalW2 is a general purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins. It produces biologically meaningful multiple sequence alignments of divergent sequences. It calculates the best match for the selected sequences, and lines them up so that the identities, similarities and differences can be seen. Evolutionary relationships can be seen via viewing Cladograms or Phylograms.

[New users, please read the FAQ.](#)

>> [Download Software](#)

YOUR EMAIL: [input] ALIGNMENT TITLE: Sequence RESULTS: interactive ALIGNMENT: full

KTUP: [input] WINDOW LENGTH: [input] SCORE TYPE: percent TOPDIAG: [input] PAIRGAP: [input]

(WORD SIZE): [input] GAP OPEN: [input] NO END GAPS: [input] GAP EXTENSION: [input] GAP DISTANCES: [input]

MATRIX: [input] GAP OPEN: [input] NO END GAPS: [input] GAP EXTENSION: [input] GAP DISTANCES: [input]

def [input] def [input] yes [input] def [input] def [input]

ITERATION: [input] NUMITER: 1

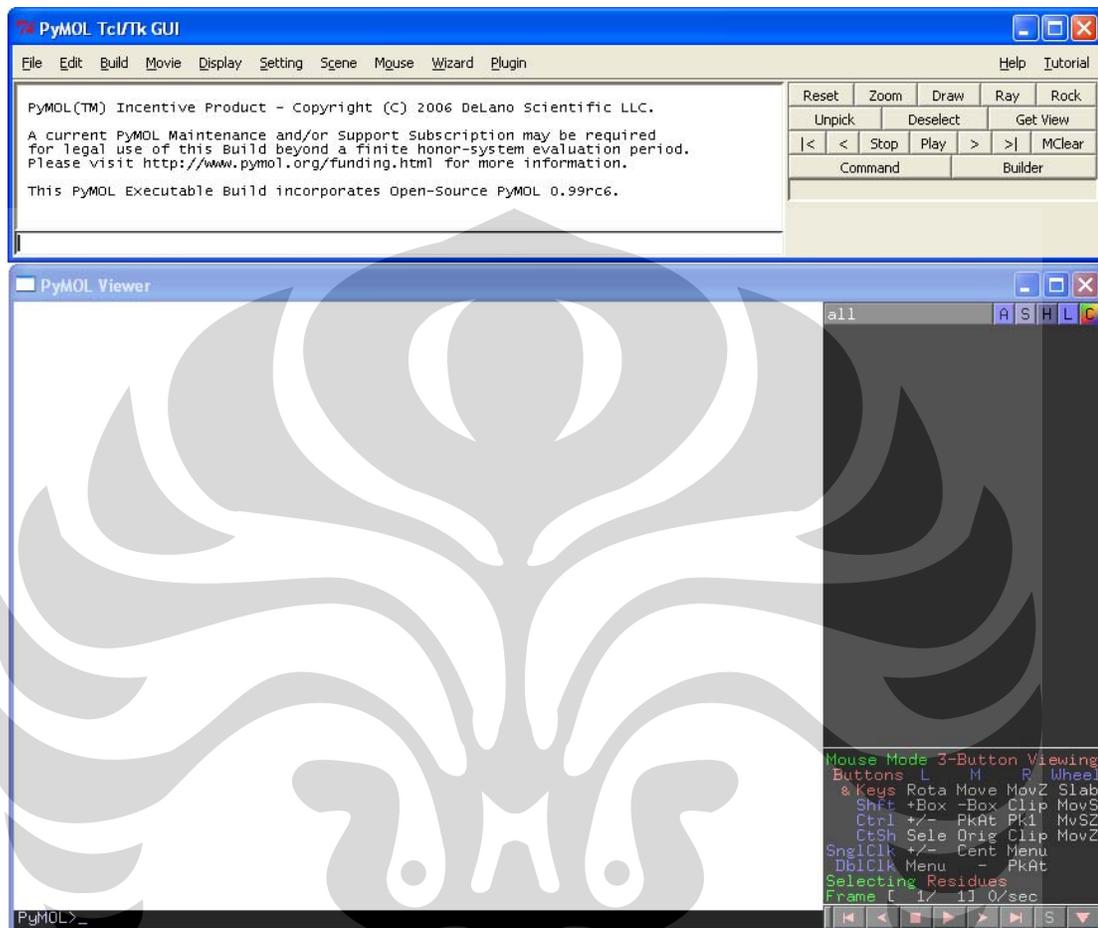
OUTPUT: [input] PHYLOGENETIC TREE: [input]

OUTPUT FORMAT: aligned OUTPUT ORDER: [input] TREE TYPE: [input] CORRECT DIST.: [input] IGNORE GAPS: [input] CLUSTERING: NJ

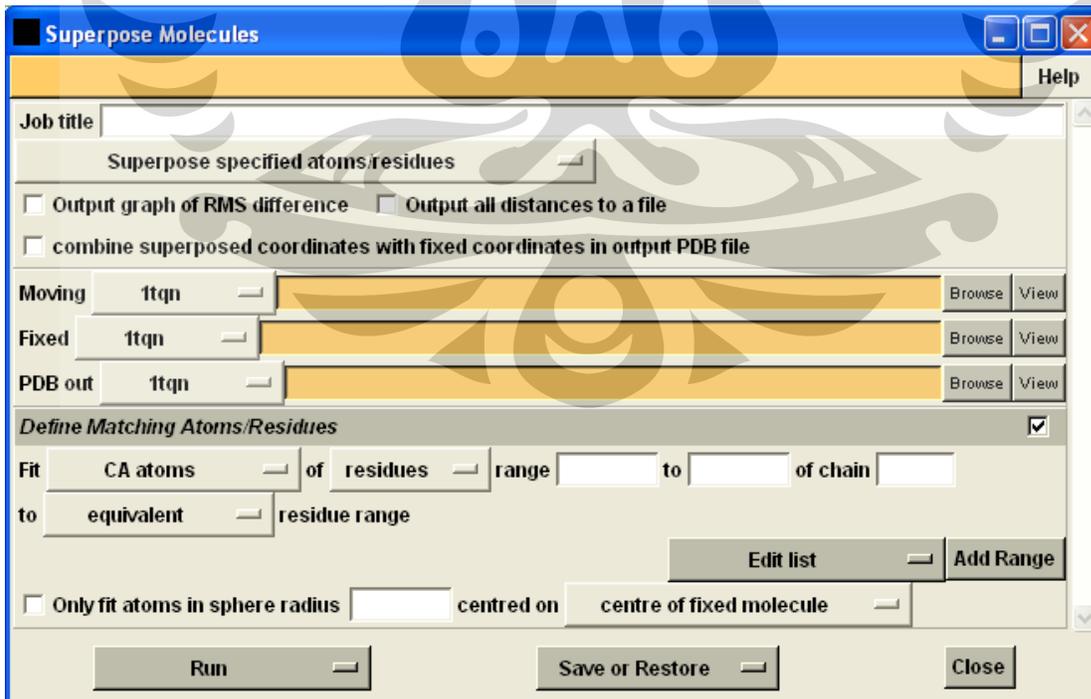
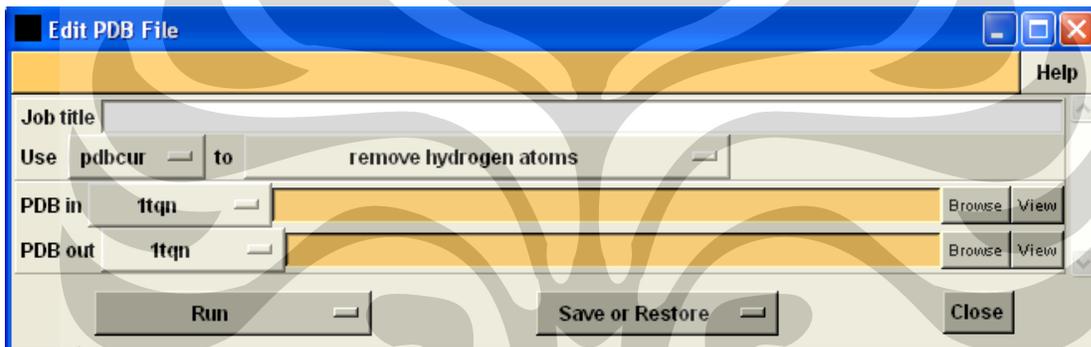
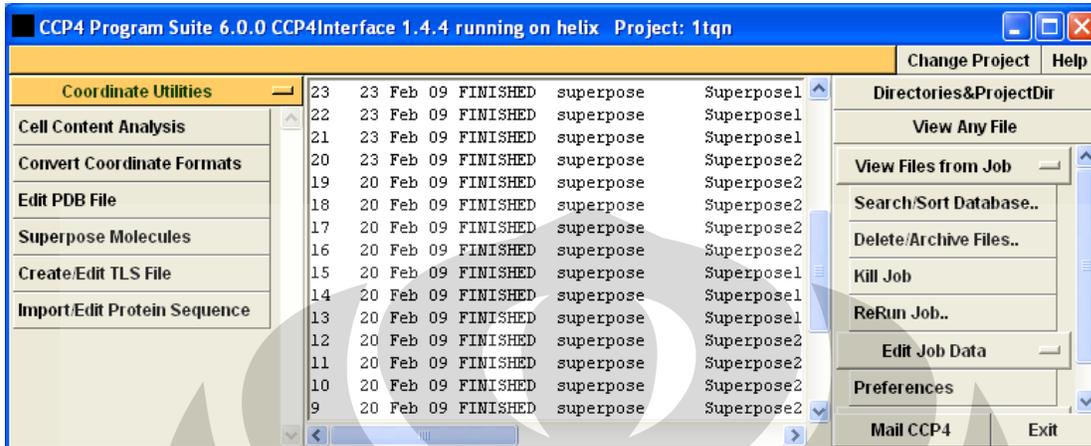
aln w/numbers [input] aligned [input] none [input] off [input] off [input] NJ [input]

Enter or paste a set of sequences in any supported format: [input] Help

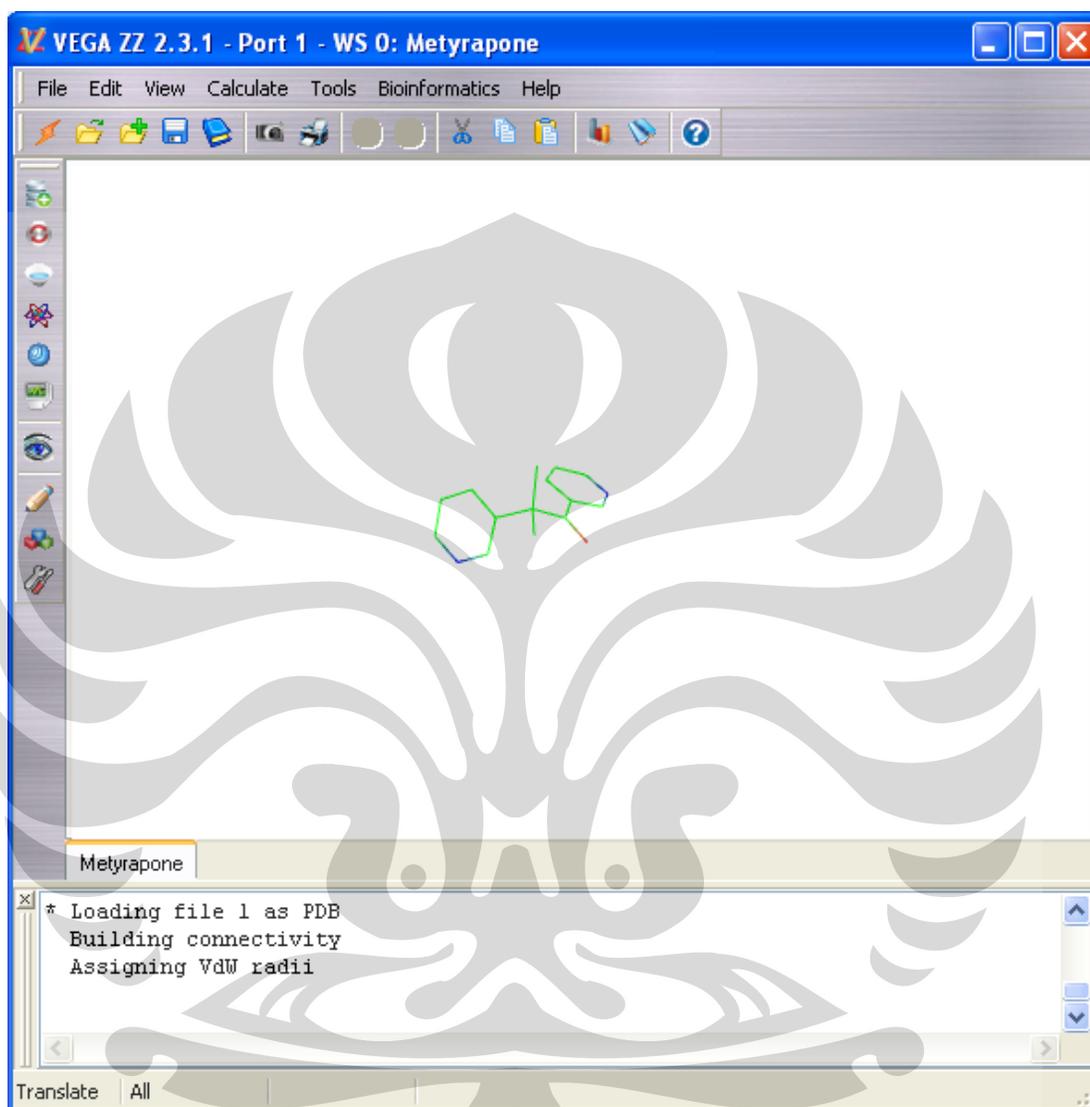
Lampiran 6. Tampilan program PyMOL



Lampiran 7. Tampilan program CCP4, Edit PDB file, dan SuperPose



Lampiran 8. Tampilan program Vega ZZ



Lampiran 9. Tampilan program AutoDock Tools (ADT)

